Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

In-vitro-Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen Adenylatkinase und verschiedenen Inhalationsanästhetika in Beziehung zum Krankeitsbild der Malignen Hyperthermie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Rolf Günter Crasser
aus Balingen

1980

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

In-vitro-Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen Adenylatkinase und verschiedenen Inhalationsanästhetika in Beziehung zum Krankeitsbild der Malignen Hyperthermie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Rolf Günter Crasser
aus Balingen

1980

Dekan:	Professor Dr. H. Heimann
Berichterstatter:	Privatdozent Dr. Dr. K. Schmidt
	Professor Dr. W. Schneider
	(Professor Dr. L. Koslowski)

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

SOFORTDRUCK H. G. VOGLER TÜBINGEN

Herrn Dr. Dr. med. Karlheinz Schmidt gilt mein ganz besonderer Dank, da er mich nicht nur bei der Planung und Durchführung der Versuche unterstützte, sondern auch als kritischer Diskussionspartner in zahlreichen Gesprächen zur Verfügung stand und durch manche Anregung zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

INHATLSVERZEICHNIS
==========

	Seite
1. Einleitung	3
2. Allgemeiner Teil	6
2.1. Die Maligne Hyperthermie	6
- Definition	
- auslösende Reagenzien	
- Vorkommen	
- Krankheitsbild beim Menschen	
- Veränderungen im Blut beim Menschen und beim Schwein	
- Veränderungen im Muskel beim Menschen und beim Schwein	
- Genetik und Voraussetzungen für die Entwicklung der MH	
- Vorstellungen über die Pathogenese	
- Die Bedeutung des Stress	
- Der ATP-Gehalt im MH-Muskel	
- Angriffspunkte der Anästhetika	
2.2. Die Adenylatkinase	18
- Namen	
- Vorkommen	
- Genetik	
- Pathologie	
- Funktion	
- Intrazellulärer Sitz	
- Chemische Eigenschaften und Struktur	
- Hemmung	
2.3. Die Anästhetika	23
- Chemische und physikalische Eigenschaften	
- Stoffwechsel der Anästhetika	
- Toxizität	
- Ort des Stoffwechsels	
- Zeitraum des Stoffwechsels	
- Umfang des Stoffwechsels	
2.4. Tübinger Hypothese - Vorstellungen zur Pathogenese der MH	28
3. Experimenteller Teil	33
3.1. Methode	33
- Prinzip	
- notwendige Geräte	
- Reagenzien	
- Puffer	
- Herstellung der Lösungen	
- Bestimmungsansatz	
- Berechnung	
- Bestimmung sehr kleiner AK-Aktivitäten	
- Genauigkeit der Messung	
- Arbeitsweise	

Seite

3.2. 1. Versuchsreihe: Die Wirkung der Anästhetika auf die AK-Aktivität in Phys. NaCl-Lösung 39
- Übersicht
- Berechnung des Molverhältnisses Anästhetikum/AK und Ergebnisse
- für Halothan
- für " Enfluran
- für " Methoxyfluran
- für " Äther
- für " Lachgas

3.3. 2. Versuchsreihe: Die Wirkung der Anästhetika auf die AK-Aktivität in Serum 47
- Übersicht
- Berechnung der Molverhältnisse Anästhetikum/AK und Ergebnisse
- für Halothan
- für " Enfluran
- für " Methoxyfluran
- für " Äther

3.4. 3. Versuchsreihe: Die Wirkung von Serum auf die AK-Aktivität 53

3.5. 4. Versuchsreihe: Die Reversibilität des durch die Anästhetika verursachten Abfalls der AK-Aktivität 54
- Methoden
- Überprüfung der Reversibilität durch Verdampfen im Vakuum
- " durch Zugabe von Serum
- " mit Hilfe von Oktan

3.6. Molverhältnis AK/Anäthetika im Muskel 58

4. Versuche: Überprüfung der Bindung von Halothan an die AK mit Hilfe der Fluoreszenz von 1,8-ANS 62

4.1. Übersicht 62

4.2. Literatur 62

4.3. Methode 63
- Notwendige Geräte
- Reagenzien
- Herstellung der Lösungen
- Inkubationsansatz

4.4. Ergebnisse 65

4.5. Tabellen 67

5. Diskussion 73

6. Zusammenfassung 86

7. Literaturverzeichnis 88

1. EINLEITUNG

An der Chirurgischen Klinik der Universität Tübingen wurden in den letzten Jahren die Erkrankungsfälle zweier Geschwister untersucht. Beide waren während einer Allgemeinnarkose an Maligner Hyperthermie (MH) erkrankt und an deren Folgen verstorben. Den übrigen Familienmitgliedern wurde daraufhin in Lokalanästhesie eine Muskelbiopsie aus dem Musculus Gastrocnemius zur Untersuchung entnommen.

Bei den Untersuchungen dieses Materials interessierte das Verhalten der Kreatinphosphokinase und der Adenylatkinase (AK) der Skelettmuskulatur.

Die Meßwerte der Kreatinphosphokinase, sowie das Verhältnis ihrer Isoenzyme - beide wurden durch die Elektrophorese des Skelettmuskelhomogenats gewonnen - lagen bei den vier untersuchten Verwandten innerhalb des Normbereichs.

Die Elektrophorese der Adenylatkinase führte jedoch zu folgenden Ergebnissen:

Bei Vater und Sohn wurden normale Intensitäten gemessen, dagegen fand man bei Mutter und Tochter nur sehr schwache Banden. Die Intensität ihrer Banden betrug nur 10%-20% derer von Vater und Sohn. Es lag keine Variante des Enzyms vor, sondern eine Defizienz (37, 64).

Danach wurden erste in vitro Versuche durchgeführt, die zeigten, daß die Aktivität der AK durch verschiedene Anästhetika gehemmt wird.

Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, daß es sich bei dem Krankheitsbild der MH möglicherweise um einen Enzymmangel handelt, der normalerweise kompensiert werden kann. Aber die Einwirkung inhibierender Substanzen wie Halothan kann die Restaktivität der AK so stark vermindern, daß eine folgenschwere Stoffwechselentgleisung eintritt, die zum Krankheitsbild der MH führt.

Hinweise über diese Möglichkeit der Ursache der MH sind in der Literatur nicht zu finden, mit Ausnahme der Arbeiten von JUNGER et al. (37) und SCHMITT et al. (64). Die in der Literatur behandelten Hypothesen legen der Krankheit entweder eine Neuropathie oder eine Myopathie zugrunde, wovon letztere als eine Membranschädigung der Muskelzelle genauer beschrieben wird.

Mit dieser Arbeit soll ein Beitrag zur Diskussion der Tübinger Hypothese geleistet werden, die die Ursache der MH in einer Defizienz der AK vermutet. Es sollte untersucht werden, ob und in welchen Molverhältnissen einige Anästhetika die AK in vitro inaktivieren und ob die Inaktivierung reversibel ist. In Zusatzversuchen wurde geprüft, ob Halothan eine Bindung mit der AK eingeht, und dadurch vielleicht inaktivierend wirkt. Dazu wurde zuerst das Wissen um die MH und die Vorstellungen über ihre Pathogenese gesammelt. Danach wurde die Literatur über die AK und die Anästhetika aufgeführt und aufgrund des in diesen drei Kapiteln erworbenen Wissens Vorstellungen zur Pathogenese der MH nach der Tübinger Hypothese erarbeitet. An die Vorbereitungen der Experimente (Methoden, Reagenzien, Berechnungen, Puffer usw.) schlossen sich zwei Versuchsreihen an, in denen die Wirkungen der Anästhetika auf die AK-Aktivität in Physiologischer NaCl-Lösung und in Serum geprüft wurden. In einer weiteren Versuchsreihe wurde geprüft, ob das Serum eine stabilisierende Wirkung auf die AK-Aktivität ausübt. Schließlich wurde die Reversibilität der Inaktivierung durch die Anästhetika untersucht.

Die inaktivierenden Molverhältnisse AK/Anästhetika aus den Versuchen wurden mit möglichen Molverhältnissen AK/Anästhetika im Skelettmuskel (aus Literaturangaben errechnet) verglichen. Dieser Vergleich sollte die Frage beantworten, ob überhaupt eine Anästhetikumkonzentration im Muskel erreicht wird, die die AK inaktivieren kann.

Im letzten Versuchsteil wurde mit Hilfe der Fluoreszenz-Spektrophotometrie untersucht, ob sich Halothan an die AK bindet und ob diese Bindung eine AK-Inaktivierung zur Folge hat.

2. ALLGEMEINER TEIL

2.1. Die Maligne Hyperthermie

Die Maligne Hyperthermie, auch Maligne Hyperpyrexie genannt (MH), ist eine schwere und oft tödlich verlaufende Komplikation einer Allgemeinanästhesie mit starken Inhalationsanästhetika oder Muskelrelaxantien. Dies macht eine Pharmakogenese dieser Erkrankung wahrscheinlich. Ihr charakteristisches Leitsymptom ist der starke Temperaturanstieg, der durch eine extreme Beschleunigung des Stoffwechsels zustande kommt.

Auslösende Agentien

Als auslösende Agentien sind drei Stoffgruppen bekannt:

a) peripher wirkende Muskelrelaxantien, z.B. Succinylcholin, Dekamethonium, d-Tubocurarin, Gallamin.

b) potente Inhalationsnarkotika: Halothan, Methoxyfluran, Diäthyläther, Cyclopropan, Enfluran und Lachgas.

c) Ketamine

d) wahrscheinlich auch Lokalanästhetika
(29, 35, 8, 56, 27, 68, 16, 23, 71)

Vorkommen

Die Erkrankung wurde beim Menschen, bei verschiedenen Schweinerassen und bei Katzen festgestellt (56, 27, 36).

Krankheitsbild beim Menschen

Möglicherweise gibt es zwei Formen dieser Erkrankung (44): Bei einer größeren Patientengruppe (80%) tritt ein hochgradiger Muskelrigor auf, während bei anderen Patienten der Rigor der Skelettmuskulatur im Hintergrund bleibt (44). Tritt der Rigor auf, so ist die Erkrankung schwer-

wiegender (44). Zwei Erkrankungsformen findet man auch bezüglich des Temperaturanstiegs: Langsamer und schneller Anstieg (44). Beim raschen T.-Anstieg kann die Körpertemperatur innerhalb 1-2h nach Zufuhr der Anästhetika auf über 42°C bis 44°C ansteigen (8).

Zu Beginn der Erkrankung entwickeln sich Tachykardie, Tachypnoe und fleckige Cyanose.

Später treten weitere Symptome auf: Herzrhythmusstörungen, respiratorische und metabolische Acidose, Verbrauchskoagulopathie, Änderung von Serumspiegeln von Enzymen und anderen Zellinnenbestandteilen, Myoglobinurie, Nierenversagen und schließlich Tod.

Es finden sich Ödeme von Gehirn, Lunge und Niere (8, 6, 22, 56, 27, 44).

Veränderungen im Blut beim Menschen und beim Schwein

Die Veränderungen, die nur beim Schwein gefunden wurden, sind mit S gekennzeichnet. Vergleiche auch die Figuren Abb 1

1.) Die ersten Veränderungen im Blut deuten auf einen beschleunigten Stoffwechsel hin, der zum Teil anaerob abläuft, denn die Beschleunigung des Stoffwechsels ist mit erhöhtem O_2-Verbrauch verbunden, worauf trotz gesteigerter Atmung eine O_2-Mangelsituation eintritt: Der pH-Wert fällt, arteriöses und venöses CO_2 steigt, es tritt eine arterielle O_2-Entsättigung auf, die sich aber allmählich wieder erholt. Lactat steigt rasch (S). Ebenso rasch steigt auch die Katecholaminkonzentration (S), während die der Freien Fettsäuren abfällt (S).

2.) Daneben und danach finden sich Veränderungen, die auf eine gestörte Membranfunktion schließen lassen: Hyperkaliämie und Hypercalcämie. Sie gehen später in eine Hypokaliämie bzw. in eine Hypocalcämie über. Es

steigen die Konzentration von Pyruvat (S), Glukose, anorgan. Phosphat und von Magnesiumionen (S).

3.) Schließlich steigen auch die Serumaktivitäten der Enzyme aus Skelett- und Herzmuskel (CPK, Aldolase, LDH, GOT, GPT u.a. Proteine), die nach anfangs starker Erhöhung im Laufe der nächsten Tage exponentiell abfallen.

4.) Man findet Hämolyse, Verbrauchskoagulopathie und Myoglobinurie.

(8, 6, 56, 61, 73, 35, 27, 43, 70)

Veränderungen im Muskel beim Menschen und beim Schwein

Histologische, elektronenmikroskopische, histo- und biochemische Untersuchungen zeigen, daß bei Patienten, die an MH erkrankt waren, die Skelettmuskulatur in Mitleidenschaft gezogen worden ist.

Histologisch finden sich beträchtliche pathologische Veränderungen: Zentrale Zelldegeneration, interstitielle chronisch entzündliche Infiltrate, Lymphozyteninfiltration, gruppierte Atrophie in anderen Gebieten.

Insgesamt eine disseminierte Schädigung der Muskulatur, wobei im einen Fall nur die mitochondrienreichen Fasern (Typ I) betroffen waren, im anderen fanden sich akute Nekrosen beider Fasertypen. (29, 6, 33, 44, 73)

Im Elektronenmikroskop fand man Gebiete mit wenig Myofibrillen, geschwollene Mitochondrien mit wenig Cristae, andere Gebiete mit ineinanderfließenden Fasern und Z-Streifenunterbrechungen (33).

Histochemisch fand sich eine atypische Faserpopulation mit Hilfe der CaEDTA-Methode, Veränderungen im Sinne einer Myotonia congenita. Bei einem anderen Patienten fanden sich keine pathologischen Veränderungen (6).

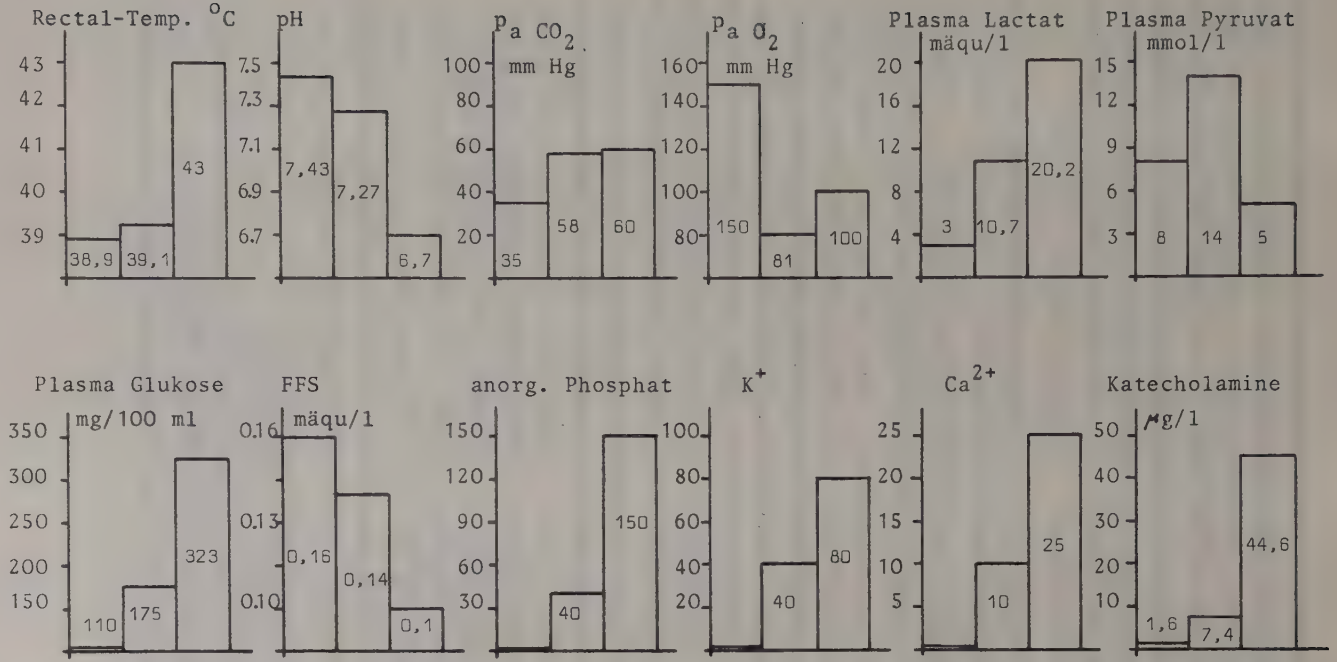


Abb. 1: Die Veränderungen im Serum beim Schwein während einer MH-Krise. Balken 1 zeigt den Wert vor Verabreichung des auslösenden Reagenz (Suxamethonium). Balken 2: 5 Min. nach Verabreichung von Suxamethonium. Balken 3: 20-30 Min. nach Gabe von Suxamethonium. (nach 43,70)

Die biochemischen Veränderungen sollen erst im Kapitel "Vorstellungen über Pathogenese" erwähnt werden.

Genetik und Voraussetzungen für die Entwicklung der MH

Es handelt sich um eine autosomal dominant vererbbare Erkrankung, die bei Männern häufiger vorkommt als bei Frauen, bei Kindern (1:15000) und Jugendlichen häufiger als bei Erwachsenen (1:50000) (8).

Reduzierte Penetranz und unterschiedliche Expressivität sind Merkmale der Erkrankung (8).

Der Krankheit können eine Anzahl verschiedener präexistenter Myopathien zugrundeliegen, die sich von Familie zu Familie unterscheiden (33). Bei 40% der Betroffenen werden sie gefunden (56). Bei solchen Patienten finden sich histologisch Kaliberschwankungen der Muskelfasern, Hypotrophien, Zentralisierung der Kerne, aufgesplitterte Fasern, zytoplasmatische Einschlüsse, vereinzelte frische Muskelfasernekrosen bei beiden Fasertypen. Auch die Phosphorylasereaktion zeigt pathologische Veränderungen. (44)

Diffuse Myopathien und auch lokalisierte Muskelabnormalitäten wurden auch bei Verwandten der Patienten gefunden: Strabismus, Ptosis, Kyphoskoliose, spontane Hernien, Gelenkdislokalisation, Muskelschwäche, Krämpfe nach Muskelarbeit, Gebiete mit Atrophie, solche mit Pseudohypertrophie, schwache oder gar keine Sehnenreflexe, EMG-Besonderheiten usw. (8), (56).

Außerdem fand man präoperativ bei Empfänglichen und ihren Verwandten oft erhöhte Serum-CPK-Werte (6).

Vorstellungen über Pathogenese

Die verbreitetste Hypothese geht von einem Defekt in einer Calcium speichernden Membran aus (8, 56).

Die defekten Membranen können das Sarkolemm, der Transverse

Tubulus, das Sarkoplasmatische Retikulum oder die Mitochondrienmembran sein (8, 11). Ob diese Membranabnormalität ein primärer Defekt ist oder sekundär aus einer anderen Ursache hervorgeht, ist nicht geklärt (8). Für einen Membrandefekt spricht die Ionenverschiebung zwischen Serum und Muskel, die während und nach der MH-Krise festzustellen ist (Enzyme, K^+, Myoglobin und Phosphat .... gehen ins Serum) (8).

Nach dieser Membrandefekt-Hypothese verläßt das Ca^{2+} seine Speicher und wandert einerseits in das Blut (Hypercalciämie, in der Frühphase der Erkrankung), andererseits in das Myoplasma (8). Im Myoplasma wirkt das Ca^{2+} vielfältig:

a) Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} führt über Hemmung des Troponins zur Kontraktion der Muskelfasern, was gesteigerten O_2-Verbrauch, gesteigerten ATP-Verbrauch und gesteigerte Wärmebildung zur Folge hat (8).

b) Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} aktiviert die Phosphorylase"b"kinase, die den Zellstoffwechsel beschleunigt, so daß über den Glykogenabbau CO_2, H_2O, Hitze, ATP und Lactat anfällt, aber auch O_2 verbraucht wird (8).

c) Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} aktiviert aber auch die Myosin-ATPase (um die Kontraktion abzubauen), die das soeben entstandene ATP wieder hydrolysiert. Dadurch fallen ADP, Phosphat und Hitze an. Es entsteht ein Mangel an ATP und dadurch an Energie (8).

d) Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} erhöht auch die Ca^{2+}-Konzentration in den Mitochondrien. Dies führt zur Entkopplung der Oxidativen Phosphorylierung. Das bedeutet, daß einerseits die Protonen aus dem Citratzyklus nicht mehr oxidiert werden, was zur Acidose führt, andererseits auch kein ATP mehr aerob hergestellt wird (8).

e) Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} benötigt einen erhöhten energieerfordernden Rücktransport in den Ca^{2+}Speicher. Dadurch steigern sich ATP-Verbrauch, Wärmebildung und Energiemangel (8).

Diese fünf unmittelbaren Wirkungen eines intrazellulären Ca^{2+} Anstiegs bewirken zahlreiche Folgevorgänge:

a) Der Energiemangel führt zu einem weiteren Lactatanfall, da wegen der Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung Energie verstärkt über andere Wege gewonnen wird:
Über die Anaerobe Glykolyse und mit Hilfe der Kreatinkinase aus CP (8, 15, 28, 35, 56, 27, 43).

b) Durch den Energiemangel kann die Funktion des Sarkolemms nicht mehr aufrechterhalten werden, was zu einer weiteren Permeabilitätserhöhung und zu pathologischer Ionenverschiebung führt: Z.B. gelangen Enzyme, Kalium, Phosphat, Myoglobin ins Serum (8).

c) Der Anfall von H^+ (Metabolische Acidose) hemmt den Ca^{2+} Rücktransport. Dies erhöht das intrazelluläre Ca^{2+} (10).

d) Der durch die Krise herbeigeführte Stress bewirkt Ausschüttung von Katecholaminen, die die Glykogenolyse und Gluconeogenese steigern (43). Sie bewirken aber auch Tachycardie, erhöhtes Herzzeitvolumen und Tachypnoe (43, 27).
Außerdem sollten die Katecholamine eigentlich die Lipolyse steigern. Trotzdem findet man verminderte Freie Fettsäuren im Blut, da hohes Plasmalactat die Lipolyse trotz Anwesenheit von Katecholaminen hemmen soll (43).

e) Der hohe intrazelluläre Ca^{2+}Anfall, der durch den Membrandefekt und durch die Transportinsuffizienz hervorgerufen wird, führt schließlich zur irreversiblen Starre der Skelettmuskulatur (8).

Der ATP-Gehalt im MH-Muskel

In der Literatur finden sich zahlreiche Hinweise über einen starken Abfall des ATP-Gehaltes im MH-Muskel:

1969 fanden HARRISON et al. (29), daß als Reaktion auf eine Inkubation und Halothan-Exposition in vitro der ATP-Gehalt im Muskelgewebe von MH-Schweinen abnorm absank. Bei gesunden Schweinen zeigte sich diese Reaktion nicht.

Ein Jahr später zeigte sich, daß das Ca^{2+}-Kontrollsystem von menschlichem Actomyosin abhängig ist von der Temperatur und der ATP-Konzentration: Mit höherer ATP-Konzentration ist eine höhere Temperatur nötig, um das Ca^{2+}-Kontrollsystem thermisch zu inaktivieren. Bei gegebener Temperatur wird die Acto-Myosin-Wechselwirkung erhöht durch Abfall der ATP-Konzentration (26). Bei steigender Temperatur ist demnach immer weniger ATP nötig, um eine Rigidität der Muskulatur zu erreichen.

JONES et al. (35) identifizierten 1972 MH-Schweine durch eine gesteigerte Entleerung des Muskel-ATP, als der entnommene Muskel in vitro einem Halothandampf ausgesetzt wurde. Alle diese Schweine erkrankten später an MH.

NELSON et al. (48) arbeiteten nach dem Verfahren von HARRISON und entdeckten wie dieser, daß sich beim normalen und beim MH-Muskel durch Inkubation mit Halothan ein Verlust an ATP einstellte, beim MH-Muskel ein sehr viel größerer als beim normalen Muskel. Allerdings ergab auch Inkubation mit einem O_2/CO_2-Gemisch einen ATP-Abfall. Er war aber nicht so groß wie bei der Inkubation mit Halothan und war im MH-Muskel ebenfalls viel stärker als im normalen Muskel. Wurden die Muskeln sofort ohne Inkubation untersucht, dann zeigte sich im ATP-Gehalt zwischen MH- und normalem Muskel kein Unterschied.

BERNHARDT und SCHILLER (6) untersuchten Muskeln zweier MH-Patienten (einer war gestorben, der andere hatte die MH überlebt). Sie fanden bei ihnen histochemische Veränderungen, die möglicherweise ein Korrelat zur ATP-Verarmung der Skelettmuskulatur hyperthermieverdächtiger Schweinerassen darstellen.

Dagegen waren sich ISAACS und HEFFRON 1975 (33) sicherer. Sie untersuchten Gesunde und Angehörige einer MH-Familie. Außerdem ein Bantu-Kind, das an MH erkrankt war und überlebte. Biopsien wurden durchgeführt und Muskel-ATP wurde enzymatisch bestimmt. Sie fanden bei den MH-Leuten verminderten ATP-Gehalt.

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse, die ISAACS et al. (34) bei Trägern der abnormen Entwicklung von MH fanden. Hier stellten sie bei allen 4 Patienten einen normalen ATP-Gehalt im Muskel fest. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von NELSON et al. 1972 überein, die beim nicht inkubierten Muskel ebenfalls keinen Unterschied im ATP-Gehalt von normalem und MH-Muskel gefunden hatten (48).

BRITT et al. (10) untersuchten die Ca^{2+}-Aufnahme in Muskeln von normalen und MH-Schweinen. Ihre Ergebnisse seien möglicherweise das Resultat der schädlichen Wirkung, die Mangel an ATP, ein niedriger pH-Wert oder eine hohe Temperatur wahrscheinlich auf den Ca^{2+}akkumulierenden Mechanismus der SR-Membrane haben.

Als frühestes Zeichen einer sich entwickelnden MH fanden GRONERT et al. (27) eine Steigerung der intrazellulären Lactat-Produktion. Sie diskutierten deshalb einen Zusammenhang zwischen der ATP-Konzentration und der Lactatbildung: Wenn der ATP-Gehalt plötzlich erschöpft ist durch überaktive zelluläre Funktionen (z.B. Ionenpumpe), dann gehe der Plasma-Redoxzustand in Richtung Reduktion und steigere so die Lactatbildung.

Schließlich noch ein Versuch von Van den HENDE et al. (70): Sie narkotisierten normale und MH-Schweine mit Halothan und stellten fest, daß im Gegensatz zu den normalen bei den MH-Schweinen der ATP-Wert deutlich absank.

Die Bedeutung des Stress

Es wurde gefunden, daß körperlicher Stress vor der Verabreichung eines auslösenden Agens die Entwicklung der MH bei Schweinen und wahrscheinlich auch beim Menschen fördert (35, 6). Dies wäre verständlich, wenn man dem Krankheitsgeschehen eine Insuffizienz des Ca^{2+}-Rückresorptionsmechanismus (6) zugrunde legen würde, die durch einen Membrandefekt oder durch einen Energiemangel der Zelle hervorgerufen würde.

Aber auch emotionaler Stress spielt wahrscheinlich eine Rolle beim Krankheitsgeschehen (38, 72, 45). KATZ (38) meint, daß das MH-Syndrom durch eine Menge nichtspezifischer Stressituationen unter Hinzufügung pharmakologischer Stimuli ausgelöst werden könnte. WINGAARD (72) ist nach umfangreichen Untersuchungen einer amerikanischen Familie mit anfälligen Individuen zu der Überzeugung gekommen, daß anfällige Patienten ein hyperaktives sympathisches Nervensystem besitzen, und er meint, daß die MH beim Menschen Teil eines menschlichen Stress-Syndroms sei.

Angriffspunkte der Anästhetika

In der Literatur ist nicht allzu gesichertes darüber zu finden.

BRITT spricht allgemein davon, daß Halothan Ca^{2+} aus defekten Speichermembranen freisetze (8, 12).

Die Frage, ob Halothan tatsächlich an der Muskelzelle angreift, scheint noch nicht endgültig gelöst: ISAACS meint, daß die primäre Basis der Muskelveränderungen entweder

neuropathisch oder neuropathisch und myopathisch ist (33). Auch BRITT hält trotz allem eine neurogene Entwicklung der MH für möglich (12). Dem widersprechen BERNHARDT et al., die den Angriffspunkt peripher von der neuromuskulären Synapse in der Muskelfaser vermuten. Ihrer Meinung nach wird durch Halothan der Ca^{2+}Stoffwechsel beeinträchtigt (6). KERR kommt durch seine Versuche zu dem Ergebnis, daß ein lokaler, neuraler Mechanismus, vielleicht ein Reflex, nötig ist, damit sich die MH entwickeln kann (39).

Wie dem auch sei, es wurden Versuche durchgeführt, die den Einfluß des Halothans auf den Ca^{2+}Transport zeigen sollten. BRITT fand, daß das Halothan bei anfälligen Individuen die Ca^{2+}Aufnahme ins Sarkoplasmatische Retikulum (SR) hemmt, aber auf Muskel von nicht anfälligen Individuen wenig Wirkung zeigt (12). ISAACS fand zunächst genau das Gegenteil: Beim anfälligen Schwein wurden die Ca^{2+}Aufnahme nicht gehemmt (33). Dann aber fand er, daß beim anfälligen Menschen die Ca^{2+}Aufnahme ins SR reduziert ist. Er konnte aber nicht zeigen, daß das auch bei normaler Temperatur der Fall ist (33). Versuche von NELSON zeigten, daß Halothan an Systemen angreifen könnte, die die sarkoplasmatische Ca^{2+}Konzentration regulieren (47).

Schließlich tauchten Ergebnisse auf, die vielleicht nähere Erkenntnisse über die eigentliche Ursache der MH bringen konnten, die aber die Hypothese der defekten Membranen von BRITT verändern: CLARK fand 1973 einen beschleunigten Substratzyklus von Fru-6-P im anfälligen Schwein. Dieser Substratzyklus wird durch Halothan weiter beschleunigt, was dann zu Temperatursteigerung, erhöhtem ATP-Verbrauch, Membran- und Strukturzerstörung und Entkopplung der Oxidativen Phosphorylierung führt (17).

BRITT berichtet über die Mitochondrienatmung von Schweinen: Sie fand, daß Mitochondrien anfälliger Schweine ATP wirkungsvoller synthetisieren als Mitochondrien nicht an-

fälliger Schweine. In Vitro greift Halothan in diesen Mechanismus ein und hemmt die Atumungskette. Die Ca^{2+}Aufnahme in Mitochondrien anfälliger Schweine war merklich geringer als die in Mitochondrien nicht anfälliger Schweine, wurde aber in vitro durch Halothan nicht verändert. Die Änderung durch Halothan sei aber so gering gewesen, daß nur eine geringe Entkopplung verursacht wurde, die zu gering ist, um für die Ausbildung der MH verantwortlich zu sein. So bleibt BRITT bei der Annahme, daß Halothan Muskelorganellen von anfälligen Individuen so zerstören könnte, daß der Ca^{2+}Strom ins Myoplasma beschleunigt wird (11, 12). HARRISON (1969) zeigte, daß der ATP-Spiegel im Muskel von anfälligen Individuen fiel, wenn er 30 Min dem Halothan ausgesetzt war (29). ISAACS (1975) hielt es deshalb für wichtig, zu erforschen, warum der ATP-Spiegel so ungewöhnlich stark abfällt. Als bedeutendstes Ergebnis fand er verminderte Konzentration an CP und an ATP und eine gesteigerte Glu-6-P Konzentration im Muskel von anfälligen Individuen. Dies deutet auf eine verminderte Bereitstellung von CP und auf eine gesteigerte Glykolyse hin (33). Das könnte zu der Annahme führen, daß im Muskel von anfälligen Individuen die ATP-Synthese in den Mitochondrien vermindert ist, was zum starken Abfall von CP und von ATP führt (33).

2.2. Die Adenylatkinase

Namen

Die Adenylatkinase (AK = EC: 2.7.4.3) wird auch entsprechend ihrer Funktion ATP:AMP-phosphotransferase und wegen ihrem Vorkommen im Muskel Myokinase genannt (49).

Vorkommen

Das Enzym kommt ubiquitär vor. Es wurde in Pflanzen, Mikroorganismen und höheren Organismen gefunden. Entsprechend seiner Funktion ist seine Konzentration dort groß, wo der Energieumsatz hoch ist. Bei den Säugetieren wird sie vor allem in Skelettmuskel, Herzmuskel, Leber und Erythrozyten, Leukozyten, Blutplättchen und Plasma, aber auch in den anderen Organen gefunden (49, 42, 30).

Genetik

Es sind verschiedene Phänotypen gefunden worden, von denen AK_1, AK_{1-2} und AK_2 die wichtigsten beim Menschen sind. Ihnen liegen die Genotypen AK^1AK^1, AK^1AK^2 und AK^2AK^2 zugrunde. Weitere seltene Phänotypen sind AK_{3-1} und AK_{4-1}. Es wird über Aktivitätsunterschiede der Phänotypen berichtet und über die unterschiedliche Verteilung der Isoenzyme in verschiedenen Organen (49).

Pathologie

Da die AK gehäuft im Muskel vorkommt, wurde daran gedacht, ihre Bestimmung zur Diagnose des Herzinfarktes einzusetzen. Diese Methode der Infarktdiagnose hat aber keine Bedeutung erlangt (49). Dann konnte die AK mit einer anderen Muskelerkrankung in Beziehung gebracht werden: Bei Patienten mit Progressiver Muskeldystrophie Typ Duchenne fand man eine AK im Skelettmuskel, die sich durch Ellman's Reagenz weniger stark inaktivieren läßt als die AK gesunder Personen (30). Außerdem fanden HEYCK et al. (31), daß bei Patienten mit derselben Krankheit drei Enzyme, darunter die AK, schon im Frühstadium der Muskelatrophie hoch-

signifikant vermindert waren. Die Aktivität der AK nahm von Schweregrad zu Schweregrad der Erkrankung signifikant ab.

Funktion (49, 51, 2)

Der Name ATP:AMP-phosphotransferase erläutert die Funktion:

$$ATP + AMP \underset{\longleftarrow}{\overset{AK}{\longrightarrow}} 2\ ADP$$

Die Katalyse dieser Reaktion ist von der Anwesenheit eines zweiwertigen Metallions abhängig. Dafür wird Mg^{2+} wegen seiner starken Wirkung herangezogen. Es bildet mit einem ATP- bzw. mit einem ADP-Molekül einen Komplex.

Das Enzym selbst besitzt zwei Bindungsstellen, eine für einen dieser Metall-Adeninnukleotid Komplexe, die andere für AMP bzw. ADP. Auf diese Weise katalysiert die AK den Übergang von Phosphat zwischen MgATP und AMP und für die Rückreaktion zwischen MgADP und ADP:

$$MgATP + AMP \underset{\longleftarrow}{\overset{AK}{\longrightarrow}} MgADP + ADP$$

Somit dient die AK der schnellen Überführung der Adeninnucleotide ineinander und hält dadurch das Gleichgewicht unter den Adeninnucleotiden aufrecht, wobei die Gleichgewichtskonstante

$$K = \frac{[ATP] \cdot [AMP]}{[ADP]^2} \quad \text{ist (49, 51)}$$

Auf diese Weise erleichtert die AK die Speicherung und die Verwertung der hohen Energie der Adeninnucleotide (49). Ein Maß für die verwertbare chemische Energie des Adenylatsystems (ATP, ADP, AMP) wird bezeichnet als "Energy Charge", der nach ATKINSON durch den Ausdruck

$$\text{Energy Charge} = \frac{([ATP] + 1/2\ [ADP])}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

definiert ist (49, 2).

Der Energy Charge (EC) kann zwischen O (Alle Adeninnucleotide als AMP vorliegend) und 1 (alle Adeninnucleotide als ATP vorliegend) variieren., wird aber in vitro bemerkenswert stabil gefunden, trotz schneller Umwandlung der Adeninnucleotide ineinander (51, 49). Diese Beobachtungen werden interpretiert als ein Ergebnis der Wirksamkeit der AK, das Gleichgewicht unter den Adeninnucleotiden aufrechtzuerhalten (51, 49).

Eine wichtige Bedeutung der Adeninnucleotide ist ihr Einfluß auf verschiedene Enzymsysteme, der durch Hemmung bzw. Stimulierung von Enzymen durch die Adeninnucleotide zustandekommt (49). Z.B. werden durch hohes ATP (EC→1) mehrere Enzyme des Zitratzyklus und der Glykolyse gehemmt oder durch AMP (EC→0) stimuliert, wogegen andere durch hohes ATP (EC→1) stimuliert oder durch hohes AMP (EC→0) gehemmt werden (49, 2). Somit kann der Energy Charge des Adenylatsystems die Zelle mit einer metabolischen Kontrolle versehen. Dadurch wird klar, welche grundlegende Bedeutung die AK über die Adeninnucleotide in der Kontrolle des Stoffwechselgeschehens innehat (49).

Intrazellulärer Sitz

Über den intrazellulären Sitz der AK gibt es verschiedene Untersuchungen: CRISS (19) fand in Rattenlebern die AK zum größten Teil zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran. BRDICZKA et al. fanden ebenfalls die gesamte AK-Aktivität von Rattenleber mitochondrien im intercristalen Raum (7). Diese Lokalisation würde der Stellung im Energiestoffwechsel entsprechen. Im Gegensatz dazu fanden LAUDAHN et al. (41) die AK menschlicher Skelettmuskeln fast vollständig im Cytoplasma, so daß eine Erhöhung der ADP-Konzentration im Myoplasma rasch abgefangen werden kann. Für die vorliegende Arbeit war es wünschenswert, die Konzentration der AK vor allem im Muskelgewebe zu erfahren.

HEYCK et al. (31) fanden 1963 folgende Werte:

	IE/g Extraktprotein	IE/g Feuchtgewicht
Gesunde	1413 ± 253	69 ± 18
Muskeldystrophie	436 ± 270	16,7 ± 8,1

Chemische Eigenschaften und Struktur

Das Enzym besitzt mit 21000g/Mol eine recht geringe Molmasse (49). Infolgedessen ist seine Instabilität, die bei verschiedenen Autoren erwähnt wurde und über die auch in dieser Arbeit berichtet wird, recht erstaunlich (vor allem BROWNSON und SPENCER (13). Dieselben Autoren konnten das Enzym aber durch Albumin stabilisieren.

Das Enzym ist zusammengesetzt aus rund 200 Aminosäuren. (Mensch: 194, Schwein: 191, Rattenleber: 216) (49). Bedeutung für die Aktivität des Enzyms haben zwei -SH-Gruppen. Substrate in Wechselwirkung mit ihnen verursachen Konformationsänderungen (53). Die -SH-Gruppen scheinen aber nicht selbst an der Substratbindung beteiligt zu sein. So haben sie wohl Bedeutung zur Bewahrung der "aktiven" Konformation (49). Im Gegensatz dazu ist aber wohl die Imidazolgruppe eines Histidins in den Katalysemechanismus einbezogen (49). Diese These wird unterstützt durch die Strukturaufklärung des AK-Kristalls. Nach ihr teilt eine Spalte das Molekül in zwei Hälften. His 36 liegt in diesem Gebiet, das für die Funktion eines katalytischen Zentrums geschaffen zu sein scheint (65).

Hemmung

In der Literatur finden sich zahlreiche Hinweise auf Inhibitoren der AK. Entsprechend der Bedeutung von zwei -SH-Gruppen für die Aktivität (siehe diese Seite) läßt sich die AK durch -SH-Reagenzien inhibieren. Allen voran Ap5A (= Diadenosinpentaphosphat) (53, 54, 55). SCHIRMER fand eine Teilinaktivierung durch Quecksilber- und Silberverbindungen und eine vollständige Inaktivierung durch Ellman's

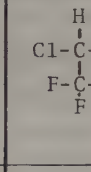
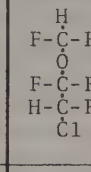
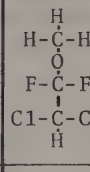
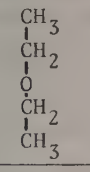
Reagenz (62). Das Enzym wird ebenfalls durch Jodacetat und Jodacetamid gehemmt. Auch diese Inhibitoren scheinen an -SH-Gruppen anzugreifen (13).

Daneben sind andere Möglichkeiten der AK-Inhibition bekannt: Produktinhibition mit ADP als Inhibitor führten zu der Ansicht, daß es sich bei der katalytischen Reaktion um einen Rapid Equilibrium Random Mechanismus handele (14). Ein anderes Zwischenprodukt des Stoffwechsels, Citrat, hemmt die Katalyse durch Bindung des zweiwertigen Metallions (Mg^{2+}) (63, 52). Auch das spezifische Arginylreagenz Phenylglyoxal inaktiviert Schweineherz-AK. Das bedeutet, daß sich in der AK ein Arginin befindet, das für die Katalyse wichtig ist (4). Im Gegensatz dazu steigern Zwischenprodukte des Citratzyklus die Aktivität der AK aus Lebermitochondrien (52).

Stabilisiert wird die AK durch Albumin und durch Dithiothreitol (13).

2.3. Die Anästhetika

Die in dieser Arbeit verwendeten Anästhetika sind Diäthyläther, Enfluran, Halothan, Lachgas und Methoxyfluran. Sie sollen hier unter gemeinsamen Gesichtspunkten besprochen werden, die für die vorliegende Arbeit und für die Aufklärung der Ursache der MH von Bedeutung sein können.

Tabelle 1	Halothan	Enfluran	Methoxyfluran	Äther	Lachgas
Formel					N_2O
Stoffklasse	Halogenierter Kohlenwasserstoff	Halogenierter Äther	Halogenierter Äther	Äther	anorg. Oxid
Ostwald Verteilungskoeffizient Blut/Gas	2,3 (40,58)	1,9 (24,58)	13 10,2 (50,58)	15,2 (40) 11,2-15,6 (66)	0,468 (40)
" Fett/Blut	60 (58)	39-45 (58)	38 (58)		
" Öl/Gas	224 (40,66)	98,5 (24)	825 (50)	50,2 (40)	1,40 (40)
Löslichkeit in Wasser	450 mg/100 ml W. (25)	280 mg/100 ml W. (20)	220 mg/100 ml W. (20)	7,5 g/100 ml W. (57)	133 mg/100 ml W. umgerechnet aus (57)
Metabolisierungsrate (%)	12-25 (58)	2,4 (58)	7-21 (49,58)		
Enzyminduktion	NADPH-Cytochrom-C-Reduktase (58)	Cytochrom P 450 (62) NADPH-Cytochrom-C-Reduktase (58)	NADPH-Cytochrom-C-Reduktase (58)		

Stoffwechsel der Anästhetika

Hierüber schreibt I. RIETBROCK (58) eine genügende Zusammenfassung:

Der Stoffwechsel der Anästhetika erfolgt durch ein unspezifisches Enzymsystem. Dieses System unterliegt einer Enzyminduktion durch die Inhalationsanästhetika, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß: Methoxyfluran und Halothan induzieren am stärksten, Enflurane scheint wenig zu induzieren, Lachgas induziert gar nicht. Beispiele einiger induzierter Enzyme sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Neben der Enzyminduktion bewirken die Anästhetika auch eine Stoffwechselhemmung. Die kompetitive Hemmung ist abhängig von der Konzentration des Anästhetikums und bezieht sich auf Oxidations- und Glukuronidierungsprozesse, wobei auch der eigene Abbau betroffen ist. Hohe Konzentrationen hemmen den Metabolismus, niedrige Konzentrationen werden von der Leber fast vollständig metabolisiert.

Wozu werden die Anästhetika abgebaut? Abbildung 2 aus der Arbeit von I. RIETBROCK gibt dafür den Überblick.

Toxizität

Äther wird zu Zwischenprodukten des normalen Zellstoffwechsels abgebaut (Äthanol und Acetaldehyd) und wirkt nicht toxischer als diese.

Für Halothan werden mehrere Abbauwege diskutiert. STIER (67) vermutet einen Radikalmechanismus. Die postulierten freien Radikale sind aber recht reaktionsfreudige Stoffe, die in den Zellbestandteilen leicht einen Angriffspunkt finden. Andere Autoren (58) vermuten in Trifluoressigsäure, Trifluoräthanol oder hydriertem Trifluoracetaldehyd toxische Eigenschaften. Trifluoräthanol sei eine sehr toxische Substanz. Weiter sollen nach Halothangabe die nicht flüchtigen Metabolite an Zellfragmente, Zellmembranen, Mitochondrien und Mikrosomen fest gebunden werden (58, 18).

Beim Abbau von Methoxyfluran fällt Fluor an, dem toxische Nierenschädigung zugeschrieben wird (58).

Metabolite von Enfluran sind den Metaboliten von Halothan und von Methoxyfluran ähnlich, so daß Organschädigungen nicht ohne weiteres auszuschließen sind (58).

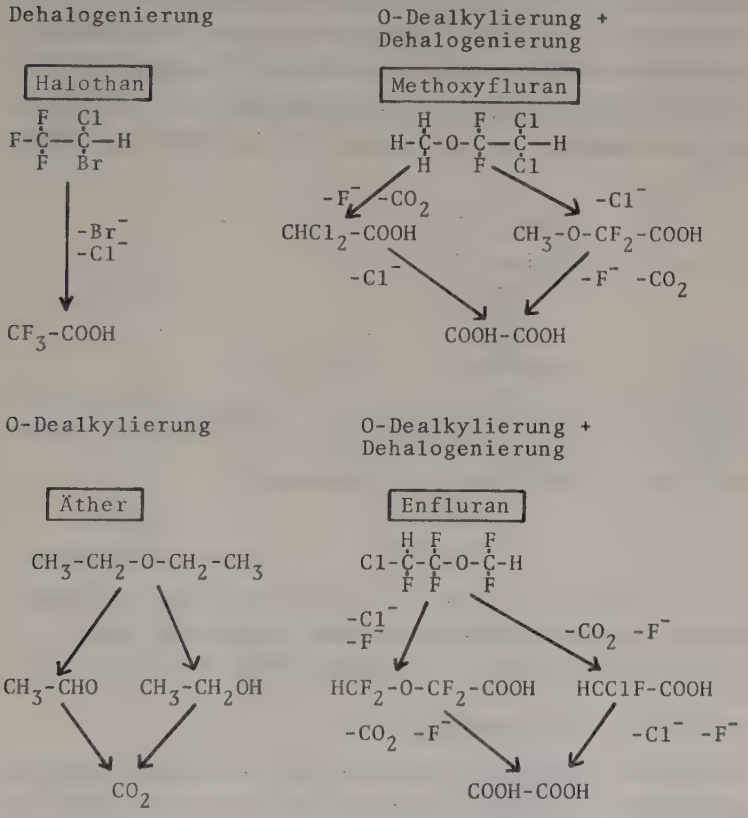


Abb. 2: Die Abbauwege der Anästhetika (RIETBROCK) (58)

Lokalisation des Stoffwechsels (58)

Der Stoffwechsel der Anästhetika findet in erster Linie in der Leber statt, und zwar im Endoplasmatischen Retikulum, da dort die Oxidations- und Synthesereaktionen des Arzneimittelstoffwechsels erfolgen. Daneben tritt der Um- und Abbau in anderen Organen zurück. Z.B. zeigten in vitro Versuche mit ^{14}C markiertem Halothan, daß die Bindung seiner nicht flüchtigen Metabolite relativ spezifisch für die Leber ist, während die Bindung in den anderen Organen (z.B. Lunge, Niere, Herz) um den Faktor 7 geringer ist.

Infolge der Lipidlöslichkeit der Anästhetika läßt sich folgendes Modell für die Verteilung im Körper darstellen:

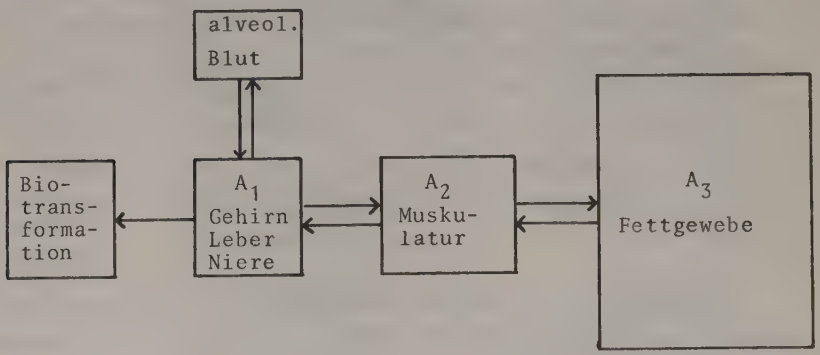


Abb. 3 Aufnahme, Verteilung, Rückverteilung und Elimination der Inhalationsanästhetika nach einem 3-Kompartimentmodell (aus I. RIETBROCK, 58)

Zeitraum des Stoffwechsels (58)

Fettgewebe stellt ein Reservoir für die Anästhetika dar. Nach beendeter Narkose setzt die Abflutung ein, auch allmählich aus dem Fettgewebe.

Für Enfluran betragen dann die Halbwertszeiten der Elimination im

zentralen Kompartiment	17,8 Min
in der Muskulatur	3,2 h
im Fettgewebe	36,7 h

Das hat zur Folge, daß der Stoffwechsel hauptsächlich in der postnarkotischen Periode erfolgt.

Umfang des Stoffwechsels

Der Anteil der Anästhetika, der nicht der reinen Abflutung sondern einem Stoffwechsel unterliegt, ist in Tabelle 1 notiert. Der verstoffwechselte Anteil von Enfluran ist sehr gering, der von Halothan und Methoxyfluran bedeutend größer.

2.4. Die Tübinger Hypothese, Vorstellungen zur Pathogenese der MH

Diese Hypothese beruht auf folgender Vermutung:

Eine durch Anästhetika induzierte MH kann nur entstehen, wenn eine Defizienz der intrazytoplasmatischen Muskel-AK vorliegt.

Wegen dieser Defizienz besitzt das Cytoplasma der Muskeln von anfälligen Individuen nur einen Teil der AK-Aktivität, die Nichtanfällige im Cytoplasma ihrer Muskeln aufweisen. Falls die Anästhetika die intrazytoplasmatische AK der Muskeln inaktivieren, könnten nichtanfällige Individuen durch die Restaktivität der AK ihren Energiestoffwechsel aufrechterhalten. Dagegen wäre die Restaktivität der AK bei anfälligen Individuen zu gering, so daß sich eine folgenschwere Entwicklung des Stoffwechsels im Muskel einstellt, die als MH bezeichnet wird.

Diese Entgleisung des Stoffwechsels sei im folgenden dargestellt:

1.) Ein Anästhetikum inaktiviert die intrazytoplasmatische Muskel-AK, die bei Anfälligen ohnehin nur einen Bruchteil der Aktivität bei Nichtanfälligen aufweist.

2.) Durch den Funktionsverlust der AK wird das Gleichgewicht der Adeninnukleotide empfindlich gestört. ATP zerfällt unter Bildung von ADP, AMP, anorganischem Phosphat und Adenosin, in geringen Mengen entsteht auch cAMP und Pyrophosphat.

3.) Im Cytoplasma entwickelt sich dadurch ein Energiemangel, der Energy Charge verringert sich.

4.) Der Energiemangel bringt das Ca^{2+}Transportsystem zum Erliegen, worauf sich das Ca^{2+} im Cytoplasma anreichert.

Anstieg des Ca^{2+} im Cytoplasma bewirkt

a) über Aufhebung der Troponinhemmung eine Kontraktion der Muskelfasern, was ATP-Verbrauch und Wärmebildung steigert.

b) Aktivierung der Phosphorylase"b"kinase, die den Zellstoffwechsel beschleunigt, so daß über den Glykogenabbau CO_2, H_2O, Hitze, ATP und Lactat anfallen, aber auch O_2 verbraucht wird. Derselbe Vorgang kann auch durch die Wirkung des erhöhten cAMP zustande kommen.

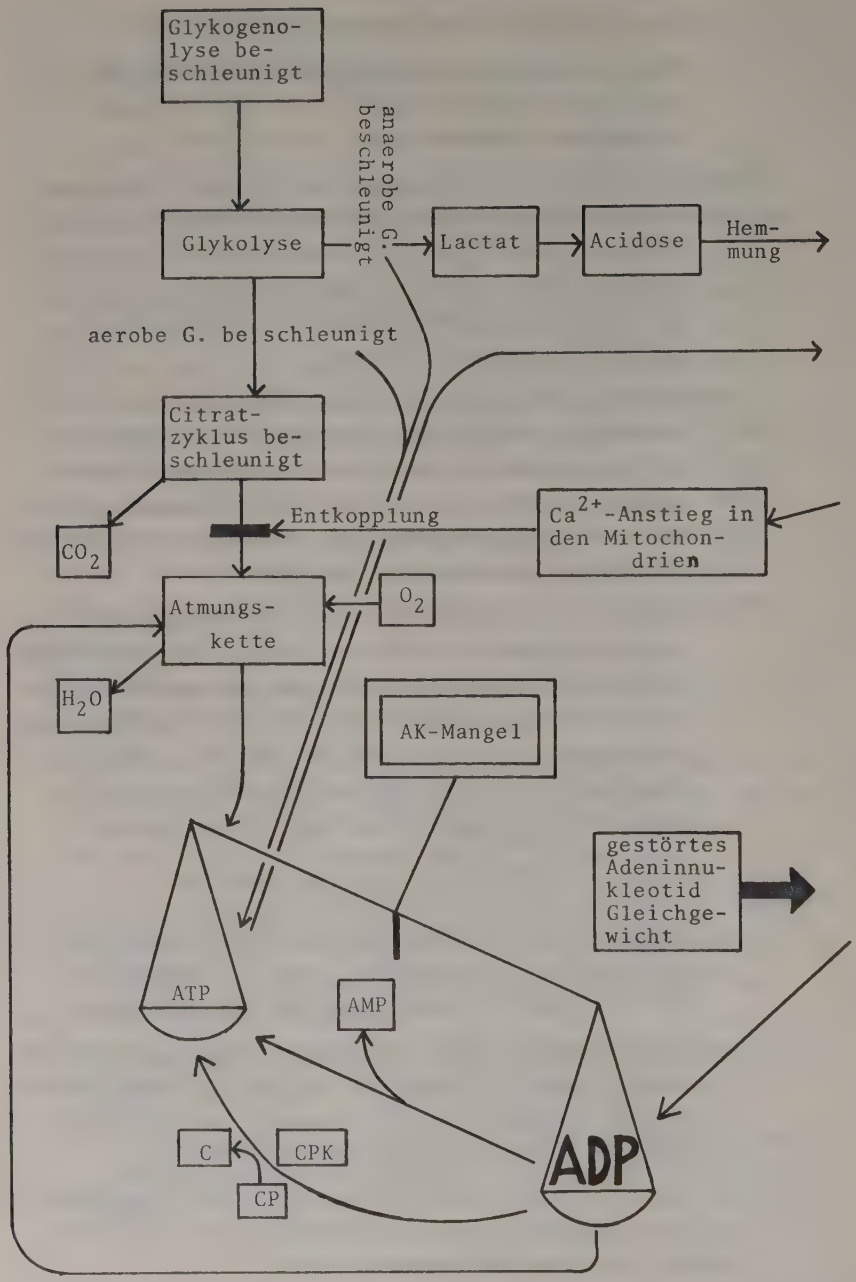
c) auch eine Aktivierung der Myosin-ATPase (um die Kontraktion abzubauen), die das vorhandene und auf verschiedenen Wegen entstehende ATP hydrolysiert. Dadurch fallen wieder die Abbauprodukte des ATP einschließlich Wärme an. Der Mangel an ATP und dadurch an Energie wird verstärkt.

d) erhöhte Ca^{2+}-Konzentration in den Mitochondrien. Dies entkoppelt im späteren Stadium der Erkrankung die oxidative Phosphorylierung. Das bedeutet, daß einerseits die Protonen aus dem Citratzyklus nicht mehr oxidiert werden, was zur Acidose führt, andererseits auch kein ATP mehr aerob hergestellt wird. Der Anfall von H^+ (metabolische Acidose) hemmt den Ca^{2+}-Rücktransport. Dies steigert die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} (10).

e) erhöhten Bedarf an energieforderndem Rücktransport in den Ca^{2+}-Speicher. Dadurch steigern sich ATP-Verbrauch, Wärmebildung und Energiemangel.

5.) Der Energiemangel führt zu Lactatanfall, da wegen relativem O_2-Mangel, hohem ATP und der Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung Energie verstärkt auch über die anaerobe Glykolyse gewonnen wird.

6.) Der Energiemangel führt zur Bildung von Ketonkörpern, da das AcetylCoA aus dem Fettsäureabbau im Citratzyklus nicht weiter abgebaut wird.


Glykogenolyse beschleunigt
Glykolyse
anaerobe G. beschleunigt
Lactat
Acidose
Hemmung
aerobe G. beschleunigt
Citratzyklus beschleunigt
Entkopplung
Ca^{2+}-Anstieg in den Mitochondrien
CO_2
O_2
Atmungskette
H_2O
AK-Mangel
gestörtes Adeninnukleotid Gleichgewicht
ATP
AMP
ADP
C
CPK
CP

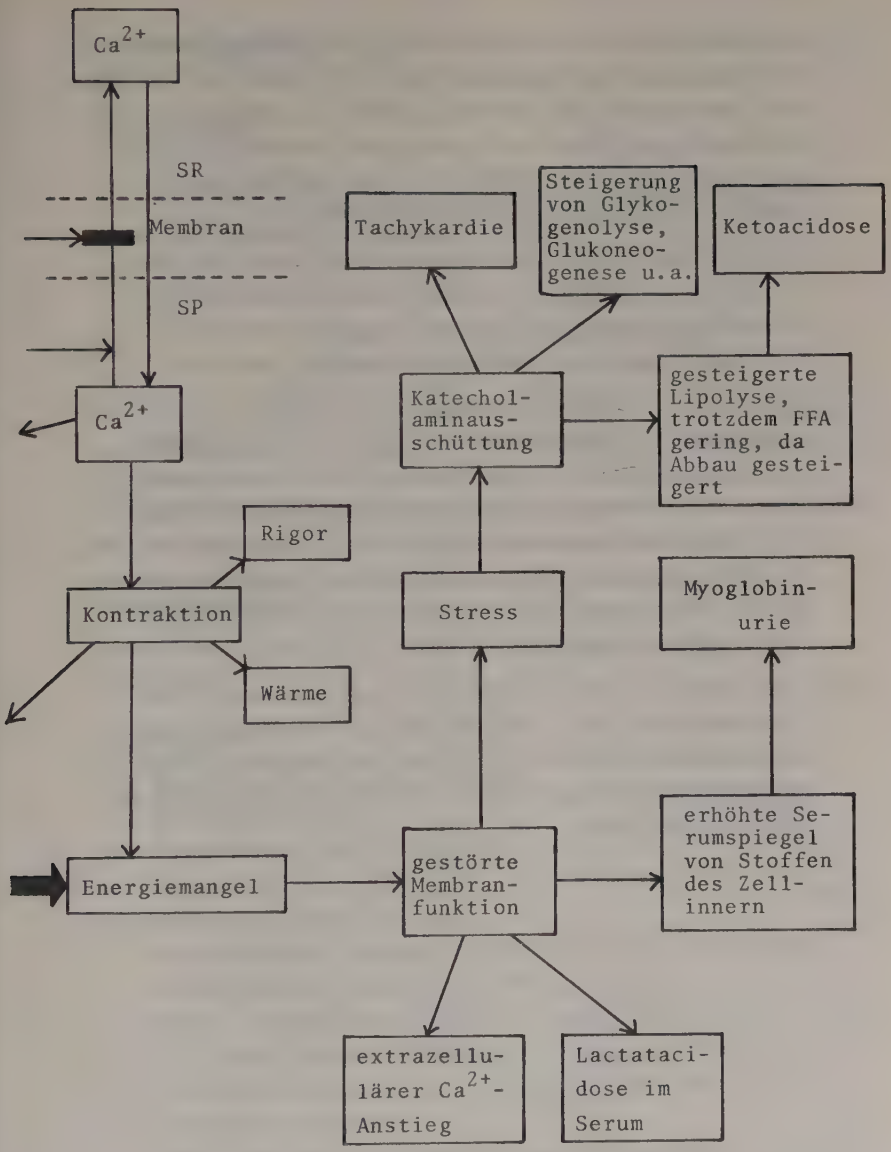


Abb. 5: Die Stoffwechselveränderungen bei der Malignen Hyperthermie nach der AK-Defizienz-Hypothese

7.) Der Energiemangel und die damit verbundenen Störungen der Transportfunktionen wirken sich nicht nur auf den Ca^{2+}-Transport aus, sondern stören allgemein die Membranfunktion. Dies wird gesteigert durch das cAMP, ein Abbauprodukt des ATP. Das cAMP erhöht unmittelbar die Zellpermeabilität (15 S 299).

8.) Die Stoffwechselveränderungen machen sich deshalb rasch im Serum bemerkbar durch Abgabe von Zellinhaltsbestandteilen: Enzyme, Kalium, Phosphat, Myoglobin usw. gelangen aus der Zelle ins Serum.

9.) Der durch die Krise herbeigeführte Stress bewirkt Ausschüttung von Katecholaminen. Sie führen zu einer Steigerung der Glykogenolyse und der Glukoneogenese, und auch zu Tachykardie, erhöhtem Herzzeitvolumen und Tachypnoe. Außerdem sollten die Katecholamine die Lipolyse steigern. Die entstehenden Freien Fettsäuren werden aber wegen des beschleunigten Stoffwechsels rasch weiter abgebaut.

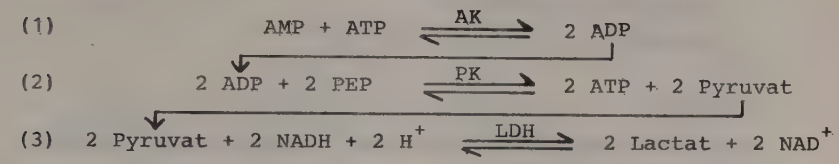
10.) Der beschleunigte Stoffwechsel und die durch hohe intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration verursachte Muskelkontraktion führen zu einer gesteigerten Wärmebildung und schließlich zur irreversiblen Starre der Skelettmuskulatur.

3. EXPERIMENTELLER TEIL

3.1. Methode

Eine Methode zur Bestimmung der AK-Aktivität geben JAWOREK, GRUBER und BERGMEYER: (5)

Prinzip:



Die NADH-Abnahme, gemessen an der Extinktionsänderung bei 366 nm ist der AMP- und ADP-Menge proportional.

Notwendige Geräte:

Spektralphotometer zur exakten Messung bei 366 nm
Schreiber

Reagentien:

1.) Triäthanolamin-hydrochlorid
2.) Kaliumcarbonat, p. a.
3.) Magnesiumsulfat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, p.a.
4.) Kaliumchlorid, p.a.
5.) Phosphoenolpyruvat, PEP
    als Tricyclohexyl-ammoniumsalz; Boehringer 15308
6.) Natriumhydrogencarbonat, $NaHCO_3$, p.a.
7.) Reduz. Nicotinamid-adenin-dinucleotid, NADH
    als Dinatriumsalz $NADH\text{-}Na_2$; Boehringer 15142
8.) Adenylatkinase, AK, als Myokinase bezeichnet
    aus Schweinemuskel
    Suspension in 3,2 M Ammoniumsulfat-Lösung;
    $\geq$ 360 U/mg (bei 25°C u. A-5-MP und ATP als Substrat)
    Boehringer 15350, 10 mg/2 ml
    Eigene Messung ergab die mehrfache Aktivität

9.) Pyruvat-Kinase, PK
aus Kaninchen-Muskel
Suspension in 3,2 M Ammoniumsulfat-Lösung
ca. 200 U/mg (25°C)
Boehringer 15744, 100 mg/10 ml

10.) Lactat-Dehydrogenese, LDH
aus Kaninchenmuskel
Suspension in 3,2 M Ammoniumsulfat-Lösung
ca. 550 U/mg (25°C)
Boehringer 15371, 25 mg/5 ml

Puffer:

Als bester pH-Wert bei den unten angegebenen Versuchsbedingungen ergab sich:

pH 7,45 siehe Abb. 5

Herstellung der Lösungen:

Puffer : 40 g Triäthanolamin-hydrochlorid in Wasser lösen. Mit K_2CO_3-Lösung auf pH 7,45 einstellen und mit Wasser auf 500 ml auffüllen.

PEP : 60 mg PEP, 1110 mg $MgSO_4.7H_2O$ u. 1,200 g KCl mit Wasser zu 12 ml lösen.

NADH : 60 mg NADH-Na_2 in 5 ml 5 % $NaHCO_3$-Lösung lösen.

PK : Stammsuspension unverdünnt verwenden.

LDH : Stammsuspension unverdünnt verwenden.

AMP : 33,3 mg mit Wasser zu 12 ml lösen.

ATP : 39,9 mg mit Wasser zu 12 ml lösen.

Bestimmungsansatz:

In die Küvette pipettieren:

Puffer	2,5	ml
ATP	0,2	ml
AMP	0,2	ml
PEP	0,2	ml
NADH	0,05	ml
LDH	0,02	ml
PK	0,02	ml
5 Min. warten		
Probe	0,1	ml
Küvetteninhalt	3,29	ml

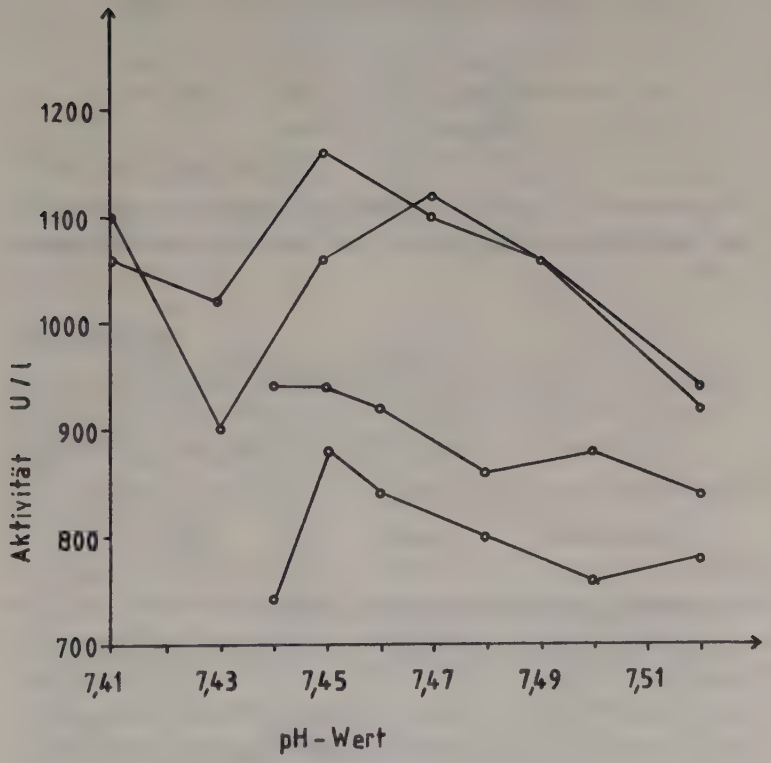


Abb.: 5 Bestimmung des optimalen pH-Wertes

Berechnung:

Aus Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse, 3. Auflage, Bd. 1, S. 334 (5)

$$(8)\ \text{Vol.-Akt.} = \frac{1000 \cdot V}{\varepsilon \cdot d \cdot v} \cdot \frac{\Delta E}{\Delta t} \quad \left[\frac{mU}{ml}\right]$$

V = Testvolumen (Küvetteninhalt) = 3,29 ml
v = Probevolumen im Test = 0,1 ml
ε = 3,3 gemessen bei 366 nm
d = 1 cm Schichtdicke

Da nun durch 1 Mol ATP 2 Mole NADH umgewandelt werden, muß die Gleichung noch mit dem Faktor 1/2 multipliziert werden:

$$\text{Vol.-Akt.} = \frac{500 \cdot V}{\varepsilon \cdot d \cdot v} \cdot \frac{\Delta E}{\Delta t} \quad \left[\frac{U}{l}\right]$$

$$\text{Vol.-Akt.} = \frac{500 \cdot 3{,}29\ ml}{3{,}3 \cdot 1cm \cdot 0{,}1\ ml} \cdot \frac{\Delta E}{\Delta t} \quad \left[\frac{U}{l}\right]$$

$$\text{Vol.-Akt.} = 5000 \cdot \frac{\Delta E}{\Delta t} \quad \left[\frac{U}{l}\right]$$

Bestimmung sehr kleiner AK-Aktivität:

Beim Bestimmungsansatz ändert sich nur die Menge der Probe: 0,2 ml
Dann ergibt sich als Küvetteninhalt: 3,39 ml
Dies sind auch die einzigen Größen, die sich auch für die Berechnung verändert haben:

V = Testvolumen (Küvetteninhalt) = 3,39 ml
v = Probevolumen im Test = 0,2 ml

Dann ergibt sich als Volumen-Aktivität:

$$(8) \quad \text{Vol.-Akt.} = \frac{1000 \cdot V}{2 \varepsilon \cdot d \cdot v} \cdot \frac{\Delta E}{\Delta t} \quad \left[\frac{mU}{ml}\right]$$

$$\text{Vol.-Akt.} = \frac{1000 \cdot 3{,}39 \text{ ml}}{2 \cdot 3{,}3 \cdot 1\text{cm} \cdot 0{,}2 \text{ ml}} \cdot \frac{\Delta E}{\Delta t} \quad \left[\frac{U}{l}\right]$$

$$\text{Vol.-Akt.} = 2570 \quad \frac{\Delta E}{\Delta t} \quad \left[\frac{U}{l}\right]$$

Genauigkeit der Messung:

Bei einem Mittelwert von 937 U/l AK (n = 6) wurde eine Standardabweichung von 9,8 U/l AK gefunden (Versuch 68). Varianz V = 1,6%.

Arbeitsweise:

Gearbeitet wurde in Glasgefäßen mit Glasschliffstopfen. Die Temperatur während der Inkubation war die Zimmertemperatur, ungefähr 20°C.

Die Temperatur der Küvette wurde durch einen Thermostaten geregelt: 25°C.

Die Adenylat-Kinase erwies sich als ein äußerst instabiles Molekül. Schon nach einer Minute kräftigen Schüttelns von Hand sank die Aktivität der AK bis auf wenige Prozente der Ausgangsaktivität. AK in Physiolog. NaCl-Lösung verlor selbst nach zweistündigem ruhigen Stehen im Exsikkator (an Wasserstrahlpumpe angeschlossen) seine Aktivität bis auf 4% in Versuch 178 und bis auf 22 % in Versuch 180.

Schütteln mußte also unter allen Umständen vermieden werden. Im einzelnen wurde folgendermaßen verfahren:
Jeweils 4 ml Phys.NaCl-Lsg. bzw. Serum wurden zum Vergleich in Inkubationsgefäße gegeben.

In andere Gläser wurden jeweils 4 ml einer an Anästhetikum gesättigten Phys.NaCl-Lsg. bzw. eines an Anästhetikum gesättigten Serums gegeben. In jedes dieser Gläser kam nun eine bestimmte Menge AK. Dabei war die AK-Suspension vorher mit Phys.NaCl-Lsg. verdünnt worden.

Die Gefäße wurden sofort gut verschlossen und 5 mal langsam um eine Querachse gedreht.
15 Minuten Inkubation
Aus jedem Inkubationsgefäß wurden 0,1 ml in eine Küvette gegeben.
Dann wurde die Extinktionsabnahme gemessen, deren Verlauf von einem Schreiber festgehalten wurde.

3.2. 1. Versuchsreihe: Die Wirkung der Anästhetika auf die AK-Aktivität in Phys. NaCl-Lösung

Alle fünf Anästhetika - Halothan, Enfluran, Methoxyfluran, Lachgas und auch Äther hemmen die Aktivität der AK, wenn das Inkubationsmilieu Phys. NaCl-Lsg. ist.
Und zwar steigt der Grad der Hemmung mit der Zunahme des Molverhältnisses Anästhetikum/AK.
Bei großen Molverhältnissen fällt die Aktivität folgendermaßen ab im Vergleich zur Ausgangsaktivität:

Halothan	senkt die Aktivität bis	unter 10%
Enfluran	"	auf 30%
Methoxyfluran	"	40%
Lachgas	"	30%
Äther	"	unter 10%

Berechnung des Molverhältnisses Halothan/AK:

Die Löslichkeit von Halothan in Wasser beträgt bei 20°C
450 mg Hal/100 ml H_2O (25)
Die Molmasse von Halothan beträgt: 197 g

Also enthalten 4 ml Phys.NaCl-Lsg.: $91{,}5.10^{-6}$ Mol Halothan

1 mg AK entspricht 360 U
Die Molmasse der AK ist 21000 g
Demnach sind $0{,}132 \cdot 10^{-9}$ Mol AK 1U

Aus den Versuchsergebnissen ergeben sich die U AK in 4 ml Inkubationslösung:
U AK/4 ml Ink.-Lsg.

Ersetzt man in einer Umrechnung die U AK durch die Anzahl der Mole AK und die 4 ml Ink.-Lsg. durch die Mole Halothan, so ergibt sich das Molverhältnis AK/Halothan:

$$\frac{U_{AK}\ \frac{0{,}132\cdot10^{-9}\ \text{Mol AK}}{1\ U_{AK}}}{4\ \text{ml Ink-Lsg}\ \frac{91{,}5\cdot10^{-6}\ \text{Mol H}}{4\ \text{ml Ink-Lsg}}} = \frac{U_{AK}\ \frac{\text{Mol AK}}{1\ U_{AK}}}{4\ \text{ml Ink-Lsg}\ \frac{690\cdot10^{3}\ \text{Mol H}}{4\ \text{ml Ink-Lsg}}}$$

Der Kehrwert ergibt schließlich das Molverhältnis von Halothan/AK

Ergebnisse:

Folgende Werte wurden gefunden:

Molverhältnis $\frac{\text{Hal}}{\text{AK}}$	$11{,}6.10^3$	$12{,}3.10^3$	$14{,}6.10^3$	19.10^3	$24{,}4.10^3$
% der Ausgangsakt.	81	96	88	75	51

Molverhältnis $\frac{\text{Hal}}{\text{AK}}$	$25\ .10^3$	$26{,}8.10^3$	$31{,}8.10^3$	$31{,}8.10^3$	$34{,}8.10^3$
% der Ausgangsakt.	59	33	52	33	30

Molverhältnis $\frac{\text{Hal}}{\text{AK}}$	$80{,}5.10^3$	$80{,}5.10^3$	175.10^3	300.10^3
% der Ausgangsakt.	23	18	7	8

Berechnung des Molverhältnisses Enfluran/AK:

Die Löslichkeit von Enfluran in Wasser beträgt bei 22°C
0,28 g Enfluran/100 ml H_2O (20)

Die Molmasse von Enfluran beträgt: 184,5 g

Also enthalten 4 ml Phys.-NaCl-Lsg.: $60{,}7\ .\ 10^{-6}$ Mol Enfluran

1 U AK sind $0{,}132 \cdot 10^{-9}$ Mol

Daraus ergibt sich dann wie bei Halothan:

$$\frac{U_{AK}\ \frac{0{,}132 \cdot 10^{-9}\ \text{Mol AK}}{1\ U_{AK}}}{4\ \text{ml Ink-Lsg}\ \frac{60{,}7 \cdot 10^{-6}\ \text{Mol E}}{4\ \text{ml Ink-Lsg}}} = \frac{U_{AK}\ \frac{\text{Mol AK}}{1\ U_{AK}}}{4\ \text{ml Ink-Lsg}\ \frac{460 \cdot 10^{3}\ \text{Mol E}}{4\ \text{ml Ink-Lsg}}}$$

Der Kehrwert ergibt wieder das Molverhältnis Enfluran/AK

Ergebnisse:

Molverhältnis Enfluran/AK	$8{,}85.10^3$	$8{,}85.10^3$	$1{,}64.10^4$	$1{,}64.10^4$	$1{,}95.10^4$
% der Ausgangsaktiv.	98	98	59	71	81

Molverhältnis Enfluran/AK	$4{,}1.10^4$	$4{,}42.10^4$	$1{,}03.10^5$	$1{,}03.10^5$	$1{,}12.10^5$
% der Ausgangsaktiv.	64	52	60	21	72

Molverhältnis Enfluran/AK	$1{,}12.10^5$	$1{,}12.10^5$	$1{,}14.10^5$	$1{,}14.10^5$	$5{,}42.10^5$
% der Ausgangsaktiv.	48	32	51	31	33

Molverhältnis Enfluran/AK	$5{,}9.10^5$	$5{,}9.10^5$	$6{,}56.10^5$
% der Ausgangsaktiv.	25	19	21

Berechnung des Molverhältnisses Methoxyfluran/AK:

Die Löslichkeit von Methoxyfluran in Wasser beträgt bei
20°C 0,22 g Methoxyfluran/100 ml H_2O (20)

Die Molmasse von Methoxyfluran beträgt: 165 g
Also enthalten 4 ml Phys.-NaCl-Lsg.:
$53{,}3.10^{-6}$ Mol Methoxyfluran

1 U AK sind $0{,}132.10^{-9}$ Mol

Daraus ergibt sich dann wie bei Halothan:

$$\frac{U_{AK}\ \frac{0{,}132\cdot10^{-9}\ \text{Mol AK}}{1\ U_{AK}}}{4\ \text{ml Ink-Lsg}\ \frac{53{,}3\cdot10^{-6}\ \text{Mol M}}{4\ \text{ml Ink-Lsg}}} = \frac{U_{AK}\ \frac{\text{Mol AK}}{1\ U_{AK}}}{4\ \text{ml Ink-Lsg}\ \frac{403\cdot10^{3}\ \text{Mol M}}{4\ \text{ml Ink-Lsg}}}$$

Der Kehrwert ergibt das Molverhältnis
Methoxyfluran/AK

Ergebnisse:

Molverhältnis Methoxyfluran/AK	$7{,}16.10^{3}$	$7{,}16.10^{3}$	$7{,}92.10^{3}$	$7{,}92.10^{3}$	$1{,}61.10^{4}$
% der Ausgangsakt.	90	90	92	91	87

Molverhältnis Methoxyfluran/AK	$1{,}65.10^{4}$	$1{,}75.10^{4}$	$3{,}7.10^{4}$	$3{,}7.10^{4}$	$4{,}6.10^{4}$
% der Ausgangsakt.	86	91	56	63	57

Molverhältnis Methoxyfluran/AK	$1{,}3.10^{5}$	$1{,}3.10^{5}$	$1{,}43.10^{5}$	$1{,}43.10^{5}$	$4{,}2.10^{5}$
% der Ausgangsakt.	36	75	72	79	18

Molverhältnis Methoxyfluran/ AK	$4{,}8.10^5$	$4{,}92.10^5$	$5{,}17.10^5$	$8{,}15.10^5$	$1{,}26.10^6$
% der Ausgangsakt.	46	33	59	48	42

Berechnung des Molverhältnisses Äther/AK:

Die Löslichkeit von Äther in Wasser beträgt bei 20°C
7,5 g Äther/100ml H_2O (57)

Die Molmasse von Äther beträgt: 74 g
Also enthalten 4ml Phys.-NaCl-Lsg.: 4,1 mMol Äther

1 U AK sind $0{,}132.10^{-9}$ Mol = $0{,}132.10^{-6}$ mMol AK

Daraus ergibt sich dann wie bei Halothan:

$$\frac{U_{AK}\ \frac{0{,}132\cdot10^{-6}\text{mMol AK}}{1\ U_{AK}}}{4\text{ ml Ink-Lsg}\ \frac{4{,}1\text{ mMol Ä}}{4\text{ ml Ink-Lsg}}} = \frac{U_{AK}\ \frac{\text{mMol AK}}{1\ U_{AK}}}{4\text{ ml Ink-Lsg}\ \frac{30{,}7\cdot10^{6}\text{ mMol Ä}}{4\text{ ml Ink-Lsg}}}$$

Und über den Kehrwert ist dann wieder das Molverhältnis Äther/AK zu bestimmen

Ergebnisse:

Molverhältnis Äther/AK	$0{,}33.10^6$	$0{,}56.10^6$	$0{,}62.10^6$	$1{,}08.10^6$	$1{,}16.10^6$
% der Ausgangsakt.	99	86	81	56	70
% der Ausgangsakt.	100	90	83	61	82

Molverhältnis Äther/AK	$2{,}7.10^6$	$2{,}8.10^6$	$10{,}8.10^6$	$20{,}2.10^6$	280.10^6
% der Ausgangsakt.	35	34	9	17	5
% der Ausgangsakt.	67	53	9	17	-

Berechnung des Molverhältnisses Lachgas/AK:

Die Löslichkeit von Lachgas in Wasser beträgt bei 20°C

67 ml = 133 mg Lachgas/100 ml H_2O (57)

Die Molmasse von Lachgas beträgt: 44 g

Also enthalten 4 ml Phys.-NaCl-Lsg.: 0,121 mMol Lachgas

1 U AK sind $0{,}132.10^{-9}$ Mol

Daraus ergibt sich dann wie bei Halothan:

$$\frac{U_{AK}\ \frac{0{,}132\cdot 10^{-6}\ \text{mMol AK}}{1\ U_{AK}}}{4\ \text{ml Ink-Lsg}\ \frac{0{,}121\ \text{mMol L}}{4\ \text{ml Ink-Lsg}}} = \frac{U_{AK}\ \frac{\text{mMol AK}}{1\ U_{AK}}}{4\ \text{ml Ink-Lsg}\ \frac{0{,}92\cdot 10^{-6}\ \text{mMol L}}{4\ \text{ml Ink-Lsg}}}$$

Der Kehrwert ergibt das Molverhältnis
Lachgas/AK

Ergebnisse:

Molverhältnis Lachgas/AK	$3{,}8.10^{+6}$	$6{,}42.10^{5}$	$1{,}4.10^{5}$	$1{,}3.10^{4}$
% der Ausgangsakt.	21	67	75	100
"	28	67	95	100
"	39	62	85	100
"	45	55	75	100

Bei dieser 1. Versuchsreihe wurde in Phys.NaCl-Lsg. gearbeitet. Zur Berechnung der Molverhältnisse wurden aber die Löslichkeiten der Anästhetika in Wasser herangezogen. Dadurch ist aber kein Fehler entstanden, denn die Ostwald-Löslichkeitskoeffizienten und damit die Löslichkeiten in beiden Medien unterscheiden sich innerhalb der Fehlerbreite nicht, wie die Tabellen von STEWARD et al. zeigen (66).

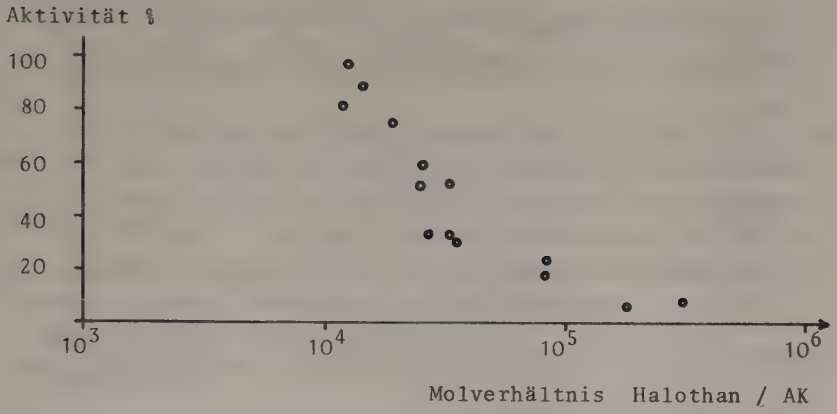


Abb. 6: AK-Inaktivierung durch Halothan in Phys. NaCl-Lsg.

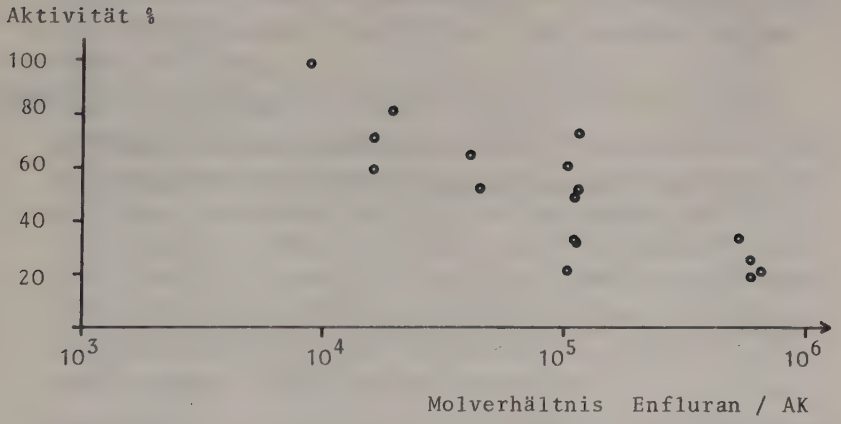


Abb. 7: AK-Inaktivierung durch Enfluran in Phys. NaCl-Lsg.

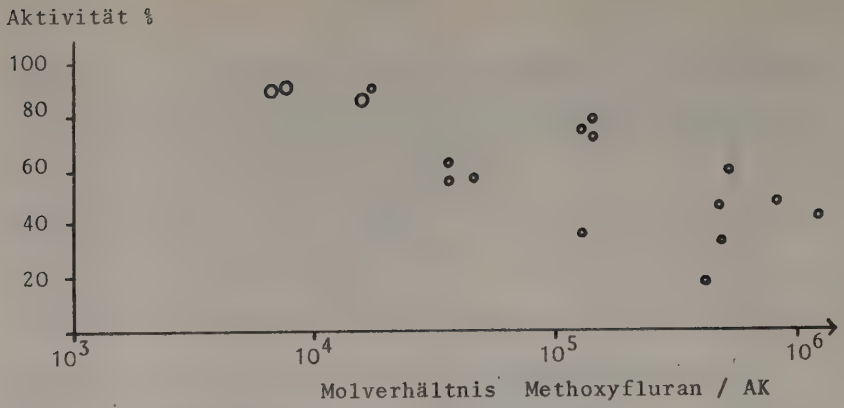


Abb. 8: AK-Inaktivierung durch Methoxyfluran in Ph.NaCl-Lsg.

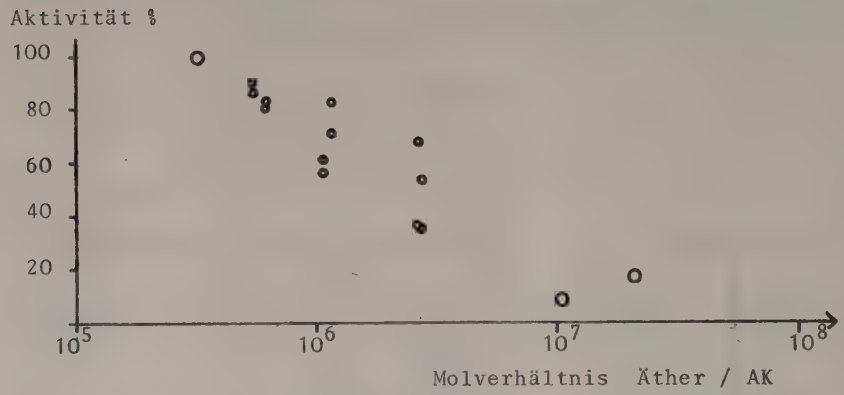


Abb. 9: AK-Inaktivierung durch Äther in Phys. NaCl-Lsg.

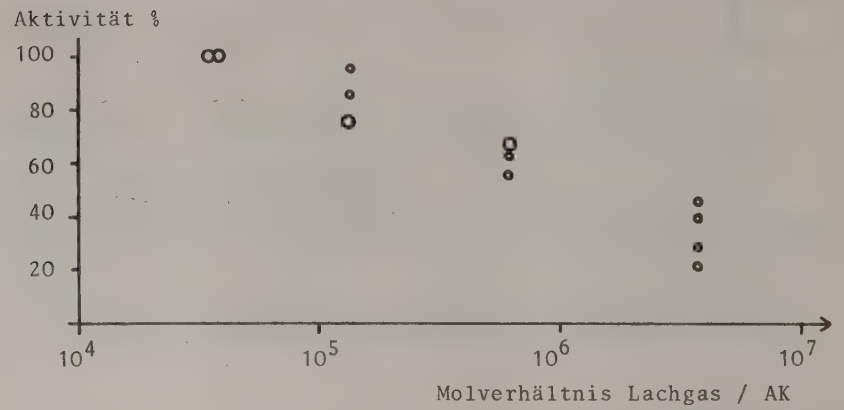


Abb. 10: AK-Inaktivierung durch Lachgas in Phys. NaCl-Lsg.

3.3. 2. Versuchsreihe: Die Wirkung der Anästhetika auf die AK-Aktivität in Serum

Alle 5 Anästhetika hemmen die AK-Aktivität kaum, wenn das Inkubationsmilieu Serum ist. Der Grad der Hemmung steigt nur wenig mit der Zunahme des Molverhältnisses Anästhetikum/AK. Bei sehr großen Molverhältnissen beträgt die Aktivität der AK immer noch 76 bis 90% der Vergleichsaktivität einer Lösung ohne Zusatz von Anästhetikum.

Das bedeutet, daß das Serum einen Schutz auf die AK-Aktivität ausübt.

Berechnung der Molverhältnisse Anästhetikum/AK

In der Literatur wurden weder Werte der Löslichkeiten noch die der Löslichkeitskoeffizienten für die Anästhetika in Serum bei einer Temperatur von 20°C gefunden.

Allerdings waren in einer Arbeit (66) die Ostwaldlöslichkeitskoeffizienten für Anästhetika in verschiedenen Medien bei 37°C angegeben. Angaben über T-Abhängigkeit wurden nicht gefunden.

Daraus ergab sich folgendes:
Diäthyläther: Die Koeffizienten von Serum/Gas und von Wasser/Gas waren fast identisch. Unter der Annahme, daß das bei einer Temperatur von 20°C auch annähernd gilt, ist die Löslichkeit des Äthers in Serum gleich groß wie die Löslichkeit in Wasser. Enfluran, Halothan, Methoxyfluran: Die Koeffizienten für die Systeme Serum/Gas und Blut/Gas sind gleich und zwei bis zweieinhalb mal größer als die Koeffizienten für das System Wasser/Gas.

Unter derselben Annahme, daß dies auch für eine Temperatur von 20°C gilt, werden hier die Löslichkeiten dieser Anästhetika in Wasser mit 2 multipliziert und diese Werte als Löslichkeiten der Anästhetika in Serum angenommen. Auf diese Weise wird natürlich nur eine sehr schwache Annäherung an die wahren Werte erreicht, doch diese genügt vollkommen,

da sich die Aktivität unter dem Einfluß der Anästhetika ohnehin kaum ändert.

Berechnung des Molverhältnisses Halothan/AK:

Löslichkeit von Halothan in Wasser bei 20°C:

450 mg Hal/100ml H_2O

Also beträgt die Löslichkeit von Halothan in Serum ungef.

1 g Hal/100ml Serum

4 ml Serum enthalten demnach ungefähr $2 \cdot 10^{-4}$ Mol Halothan bei Sättigung.

Die in der 1. Versuchsreihe entwickelte Formel lautet dann:

$$\frac{U_{AK} \; \frac{0{,}132 \cdot 10^{-9} \text{ Mol AK}}{1 \; U_{AK}}}{4 \text{ ml Ink-Lsg} \; \frac{2 \cdot 10^{-4} \text{ Mol H}}{4 \text{ ml Ink-Lsg}}} = \frac{U_{AK} \; \frac{\text{Mol AK}}{1 \; U_{AK}}}{4 \text{ ml Ink-Lsg} \; \frac{15 \cdot 10^{5} \text{ Mol H}}{4 \text{ ml Ink-Lsg}}}$$

Der Kehrwert ergibt schließlich das Molverhältnis von Halothan/AK

Ergebnisse:

Molverhältnis Hal/AK	$3{,}7.10^4$	$7{,}4.10^4$	$1{,}5.10^5$	$4{,}8.10^5$
% der Ausgangsaktiv.	86 83	90 90	95	90 90

Molverhältnis Hal/AK	$4{,}8.10^5$	$6{,}5.10^5$	$2{,}5.10^6$	$4{,}5.10^6$
% der Ausgangsaktiv.	90 90	89	76	80

Molverhältnis Hal/AK	$4{,}5.10^6$	$4{,}5.10^6$	$4{,}5.10^6$
% der Ausgangsaktiv.	84	80	80

Berechnung des Molverhältnisses Enfluran/AK:

Die Löslichkeit von Enfluran in Wasser beträgt bei 22°C

0,28 g Enfluran/100ml H_2O

Dann beträg seine Löslichkeit in Serum ungefähr

0,6 g Enfluran/100 ml H_2O

4 ml Serum enthalten also $1,2 \cdot 10^{-4}$ Mol Enfluran bei Sättigung.

Die Formel für das Molverhältnis lautet:

$$\frac{U_{AK} \quad \frac{0,132 \cdot 10^{-9} \text{ Mol AK}}{1\ U_{AK}}}{4 \text{ ml Ink-Lsg} \quad \frac{1,2 \cdot 10^{-4} \text{ Mol E}}{4 \text{ ml Ink-Lsg}}} = \frac{U_{AK} \quad \frac{\text{Mol AK}}{1\ U_{AK}}}{4 \text{ ml Ink-Lsg} \quad \frac{9 \cdot 10^{5} \text{ Mol E}}{4 \text{ ml Ink-Lsg}}}$$

Der Kehrwert ergibt schließlich das Molverhältnis von Enfluran/AK

Ergebnisse:

Molverhältnis Enfluran/AK	10^5	10^5	10^5	10^5
% der Ausgangsakt.	98	96	98	99

Molverhältnis Enfluran/AK	3.10^6	3.10^6	3.10^6	3.10^6
% der Ausgangsakt.	95	95	95	95

Berechnung des Molverhältnisses Methoxyfluran/AK:

Die Löslichkeit von Methoxyfluran in Wasser beträgt bei 20°C

0,22 g Methoxyfluran/100 ml H_2O

Also beträgt seine Löslichkeit in Serum ungefähr

0,5 g Methoxyfluran/100 ml H_2O

4 ml Serum enthalten somit $1,1 \cdot 10^{-4}$ Mol Methoxyfluran bei Sättigung.

Die Formel für das Molverhältnis lautet:

$$\frac{U_{AK} \; \frac{0,132 \cdot 10^{-9} \text{ Mol AK}}{1 \; U_{AK}}}{4 \text{ ml Ink-Lsg} \; \frac{1,1 \cdot 10^{-4} \text{ Mol M}}{4 \text{ ml Ink-Lsg}}} = \frac{U_{AK} \; \frac{\text{Mol AK}}{1 \; U_{AK}}}{4 \text{ ml Ink-Lsg} \; \frac{8 \cdot 10^{5} \text{ Mol M}}{4 \text{ ml Ink-Lsg}}}$$

Der Kehrwert ergibt schließlich das Molverhältnis von Methoxyfluran/AK

Ergebnis:

Molverhältnis Methoxyfluran/AK	24.10^5	24.10^5	24.10^5	24.10^5
% der Ausgangsaktiv.	92	92	88	88

Molverhältnis Methoxyfluran/AK	$0,9.10^5$	$0,9.10^5$	$0,9.10^5$	$0,9.10^5$
% der Ausgangsaktiv.	93	97	97	99

Berechnung des Molverhältnisses Äther/AK:

Da die Löslichkeiten von Äther in Wasser und in Serum ungefähr gleich groß sind, kann die Formel für das Molverhältnis aus der 1. Versuchsreihe übernommen werden:

$$\frac{U_{AK} \quad \frac{\text{Mol AK}}{1\ U_{AK}}}{4\ \text{ml Ink-Lsg} \quad \frac{3 \cdot 10^7\ \text{Mol Ä}}{4\ \text{ml Ink-Lsg}}}$$

Der Kehrwert ergibt das Molverhältnis von Äther/AK

Ergebnis:

Molverhältnis Äther/AK	10^8	10^8	10^8	10^8
% der Ausgangsaktiv.	82	82	82	76

Molverhältnis Äther/AK	$3{,}5.10^6$	$3{,}5.10^6$	$3{,}5.10^6$	$3{,}5.10^6$
% der Ausgangsaktiv.	89	92	95	90

In dieser zweiten Versuchsreihe wurde kein Versuch mit Lachgas unternommen, weil es nicht möglich war, das Serum unter Durchspülen mit Lachgas zu sättigen.

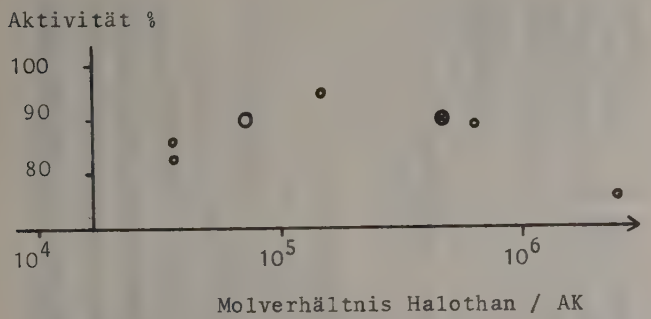


Abb. 11: AK-Inaktivierung durch Halothan in Serum

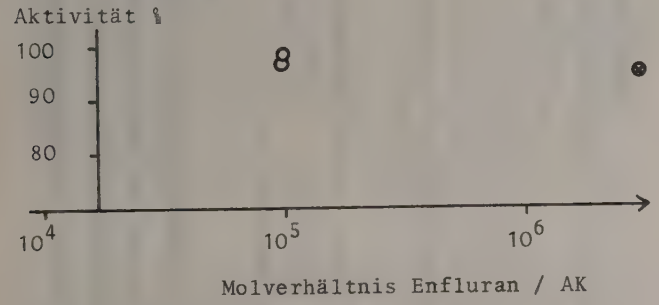


Abb. 12: AK-Inaktivierung durch Enfluran in Serum

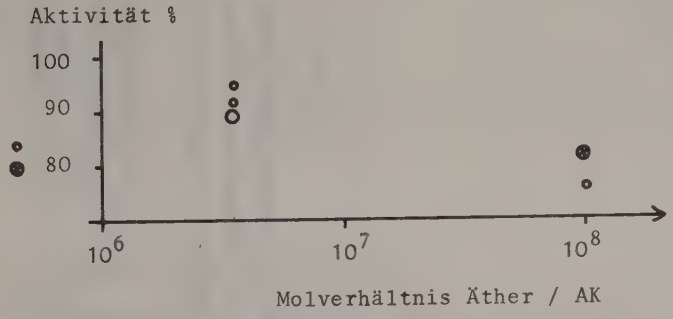


Abb. 13: AK-Inaktivierung durch Äther in Serum

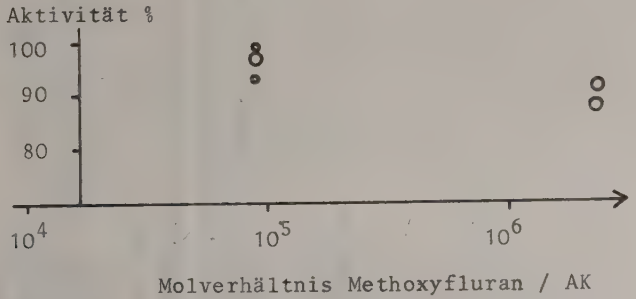


Abb. 14: AK-Inaktivierung durch Methoxyfluran in Serum

3.4. 3. Versuchsreihe: Die Wirkung von Serum auf die AK-Aktivität

Aus der zweiten Versuchsreihe war zu ersehen, daß das Serum einen Schutz auf die AK-Aktivität ausübt. Daraus ergibt sich die Frage, wie sich die Aktivität der AK einerseits in Serum, andererseits in Phys. NaCl-Lsg verhält.

Dazu wurden je 4 ml Phys. NaCl-Lsg bzw. 4 ml Serum mit je 0,002 ml AK versetzt und 1 Min inkubiert, bzw. mit je 0,02 ml AK versetzt und je 6 Min inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden die Aktivitäten gemessen.

Die Aktivitäten der AK in Phys. NaCl-Lsg lagen deutlich unterhalb der Aktivitäten in Serum.

Versuch	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Milieu	Ser.	Ser.	Ser.	Salz-Lsg.	Salz-Lsg.	Salz-Lsg.	Ser.	Ser.	Salz-Lsg.	Salz-Lsg.
I-Zeit	6 Min	6	6	6	6	6	1	1	1	1
AK-zugabe	2 µl	2	2	2	2	2	20	20	20	20
AK-Akt. /l	190	190	195	135	115	140	1100	1025	950	975
in %	100 %			66 %			100 %		91 %	

Außerdem ist zu erkennen, daß bei Verlängerung der Inkubationszeit die AK-Aktivität in Serum weit schwächer abfällt als die Aktivität in Phys. NaCl-Lsg.

3.5. 4. Versuchsreihe: Die Reversibilität der Anästhetika - induzierten AK-Inaktivierung

Zur Prüfung der Reversibilität mußte das Anästhetikum aus der Inkubationslösung entfernt werden, nachdem es eine Aktivitätsverminderung verursacht hatte. Dadurch kann das Anästhetikum aus seiner Bindung an die AK befreit werden.

Dies wurde auf drei Arten versucht:

1.) Zu den 4 ml Inkubationslösung, die das Anästhetikum enthielt, wurden 4 ml Serum gegeben. Auf diese Weise sollten die Proteine des Plasmas die gelösten Anästhetika binden und somit der Lösung entziehen.

2.) Die Inkubationslösungen wurden im Exsikkator 1 bzw. 2 Stunden lang dem Vakuum der Wasserstrahlpumpe ausgesetzt, um die leicht flüchtigen Anästhetika zu verdampfen.

3.) Die Inkubationslösungen wurden 10 bis 13 Mal während 1 bis 2 Stunden mit iso-Oktan überschichtet, um die hydrophoben Anästhetika aus der wässrigen Inkubationslösung zu extrahieren.

4.) Das folgende Verfahren konnte nicht angewandt werden: Ein Stickstoffstrom sollte die Inkubationslösungen durchspülen und sie von den leicht flüchtigen Anästhetika befreien. Bei diesem Verfahren wurde aber die Aktivität der AK wie beim Schütteln zu stark vermindert. Wenn nun der Aktivitätsabfall der AK reversibel sein sollte, müßte er nach der Behandlungszeit annähernd den Wert erreichen, den eine gleichbehandelte Vergleichslösung ohne Anästhetikum nach derselben Zeit erreicht hatte.

Im einzelnen wurde folgendermaßen verfahren:
4 ml Phys. NaCl-Lsg bzw. 4 ml einer an Anästhetikum gesättigten Phys NaCl-Lsg wurden mit je derselben Menge AK

versetzt und deren Aktivität nach 15 Minuten gemessen. Danach wurden beide ein bis mehrere Stunden nach einem der drei oben genannten Verfahren behandelt. Anschließend wurde die Aktivität beider Lösungen erneut bestimmt.

In den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse zusammengestellt. Die Aktivitäten wurden in U/l angegeben. Die Prozentangaben der Aktivitäten beziehen sich jeweils auf die Aktivitätswerte der Inkubationslösungen ohne Anästhetika. Diese erhalten sowohl vor als auch nach der Behandlung einen Wert von 100%. Die mit Anästhetika gesättigten Inkubationslösungen müssen demnach vor der Behandlung eindeutig unter 100% liegen. Falls die Aktivitätsverminderung reversibel sein sollte, müßten sich die Werte nach der Behandlung wieder stark dem 100%-Wert angenähert haben.

Überprüfung der Reversibilität durch Verdampfen der Anästhetika im Vakuum

Anästhetikum	Aktivität vor dem Verdampfen		Aktivität nach dem Verdampfen		Dauer der Vakuumeinwirkung
——	23	100%	2,6	100%	1h
Lachgas	5	18%	1	38%	
——	112	100%	24,5	100%	2h
Äther	95	85%	3,5	14%	
Enfluran	96,5	86%	2,5	10%	
Methoxyfluran	95	85%	5	20%	
——	195	100%	84	100%	1h
Halothan	65	33%	2,5	3%	

Überprüfung der Reversibilität durch Zugabe von Serum

Anästhetikum	Aktivität vor Serumzugabe		Aktivität nach Serumzugabe		Zeitdauer der Einwirkung des Serums
——	25,7	100%	17,5	100%	
Lachgas	4,37	17%	3,86	22%	1h
Lachgas	11,3	44%	8,5	49%	
——	31	100%	20	100%	
Lachgas	2	7%	2,3	12%	1h
Lachgas	2	7%	2,6	13%	
——	33,5	100%	19	100%	
Äther	2	6%	3,5	18%	
Enfluran	24	72%	13,5	71%	4h
Methoxy-fluran	19	57%	11,5	61%	
——	93	100%	47	100%	
Äther	14	15%	6	13%	
Enfluran	64	74%	39	83%	2h
Methoxy-fluran	86	93%	6	13%	
——	215	100%	110	100%	1h
Halothan	110	51%	12,5	11%	
——	210	100%	92	100%	1h
Halothan	125	59%	25	27%	

Überprüfung der Reversibilität mit Hilfe von Oktan

Anästhetika	Aktivität vor Oktanzugabe		Aktivität nach Oktanzugabe		Dauer und Anzahl der "Extraktionen"
——	25,7	100%	13,5	100%	1h 10 Mal
Lachgas	2,57	10%	1,03	7,5%	
Lachgas	5,14	20%	1,03	7,5%	
——	44	100%	25	100%	90 Min 13 Mal
Äther	2	5%	0,5	2%	
Enfluran	25	79%	8,6	35%	
Halothan	19	43%	0,5	2%	
Methoxy-fluran	24	54%	0,5	2%	
——	42	100%	1,13	100%	2h 10 Mal
Äther	2	5%	0,5	44%	
Enfluran	30	71%	1	89%	
Halothan	20	48%	0,75	67%	
Methoxy-fluran	23	55%	0,75	67%	

3.6. Molverhältnis AK/Anästhetika im Muskel

Während in den bisherigen Versuchen die Molverhältnisse AK/Anästhetika gefunden wurde, durch die die AK in vitro inaktiviert wird, sollen jetzt die Molverhältnisse im Muskel berechnet werden, um zu erfahren, ob im Muskel überhaupt inaktivierende Molverhältnisse vorkommen. Zur Berechnung dieser Molverhältnisse werden zwei Daten benötigt:

a) Die Konzentration der Anästhetika im Muskel.

b) Die Aktivität der AK im Muskel.

Zu a) Information hierzu liefert (66). Siehe auch Tabelle 1 . Die hier erwähnten Daten zeigen die Ostwald-Löslichkeitskoeffizienten der Anästhetika im Muskel, d.h., die Lösungen der Anästhetika im Muskel sind gesättigt.

Während einer Narkose wird aber wohl Sättigung der Anästhetika im Muskel nicht erreicht, so daß hier mit einer viel zu hohen Konzentration der Anästhetika gerechnet wird.

Dennoch soll diese Berechnung durchgeführt werden, denn es kommt nicht darauf an, das tatsächliche Molverhältnis genau zu bestimmen, sondern es soll geprüft werden, ob während einer Narkose überhaupt die Molverhältnisse vorkommen können, die aufgrund der hier durchgeführten Versuche gefordert werden.

Zu b) Information hierzu liefern (41) und (31).
Es stehen vier Zahlen zur Auswahl:
Die Aktivität der AK Muskelgesunder bezogen auf g Extraktprotein und bezogen auf g Feuchtgewicht.
Die Aktivität der AK im Muskel von Patienten mit Muskeldystrophie Typ DUCHENNE, ebenfalls bezogen auf g Extraktprotein und bezogen auf g Feuchtgewicht.

	IE/g Extraktprot.	IE/g Feuchtgewicht
Gesunde	1413 ± 253	69 ± 18
Muskeldystrophie	436 ± 270	16,7 ± 8,1

Die Anästhetika gehen im Muskel mit vielen verschiedenen Molekülen mehr oder weniger starke Verbindungen ein, auch mit den Proteinen.

Um das Molverhältnis AK/Anästhetika zu berechnen, bringt die Zahl der Einheiten/g Extraktprotein wenig, da der Anteil der AK am Extraktprotein nicht bekannt ist. Bleibt die andere Zahl bezogen auf g Muskelfeuchtgewicht. Nun ist es erforderlich, die Anzahl der IU AK im g Muskelfeuchtgewicht in Beziehung zu setzen mit der Anzahl der Mole AK im g Muskelfeuchtgewicht. Darüber gibt NODA (49) Auskunft:

Nach intensiver Reinigung war Menschenmuskel-AK isoliert worden mit einer Aktivität von 1920 U/mg.
Jetzt läßt sich die Anzahl der Mole je g Feuchtgewicht errechnen:

1920 U entsprechen 1 mg AK
1 g Muskel enthalten 69 U AK
69 U AK entsprechen 36.10^{-6} g AK
21000 g AK sind 1 Mol
69 U AK sind $1,7.10^{-9}$ Mol AK

1 g Muskelfeuchtgewicht enthält $1,7\ 10^{-9}$ Mol AK

Die Tabelle 2 zeigt schrittweise die Berechnung des Molverhältnisses AK/Anästhetikum im Muskel (a-g). In den Spalten i und k stehen die in den Versuchen gefundenen Molverhältnisse zu Beginn und am Ende der Inaktivierung. Spalte l zeigt die Molverältnisse für den Fall, daß die AK nur ein Drittel der normalen Aktivität im Muskel besitzt. Die Spalten h und m zeigen die erhalten gebliebenen Restaktivitäten in % der Aktivitäten des Ausgangswertes und zwar für die Molverhältnisse aus den Spalten g bzw. l.

Tabelle 2	Halothan	Methoxyfluran	Äther
a) Löslichkeit des Anästhetikums in Wasser bei 20°C	450mg/100ml H_2O	0,22g/100ml H_2O	7,5g/100ml H_2O
b) Löslichkeit des Anästhetikums in Wasser bei 20°C	4,5mg/1g H_2O	2,2mg/1g H_2O	75 mg / 1 g H_2O
c) Löslichkeit des Anästhetikums im Muskel	9x4,5mg/1g M. =40mg/1g M.	5x2,2mg/1g M =11mg/1g M	60-70mg/1g M
d) Molmasse des Anästhetikums	197 g	165 g	74 g
e) Wieviel Mole Anästhetikum enthält 1g Muskel maximal?	0,2 m Mol	67.10^{-6} Mol	0,8 m Mol
f) 1 g Muskel enthält	$1,7.10^{-9}$ MolAK	$1,7.10^{-9}$ MolAK	$1,7.10^{-9}$ MolAK
g) AK / Anästhetikum	1 : 12000	1 : 40000	1 : 47000
h) Restaktivität in % der Aktivität des Ausgangswertes	Aktivität: 90 %	Aktivität: 67 %	Aktivität: 100 %
i) Molverhältnis zu Beginn der Aktivitätsverminderung in den Versuchen	1 : 10 000	1 : 10 000	1 : 400 000
k) Molverhältnis am Ende der Aktivitätsverminderung in den Versuchen	1 : 100 000	$1 : 10^6$	$1 : 10^8$
l) Molverhältnisse für den Fall, daß die AK nur 1/3 der normalen Aktivität im Muskel besitzt	1 : 36 000	1 : 120 000	1 : 140 000
m) % der Aktivität des Ausgangswertes, hervorgerufen durch ein Molverhältnis bei 1/3 des normalen AK Gehaltes	35 - 40 %	45 - 50 %	100 %

Halothan: Bei normaler AK-Konzentration würde im Muskel ein Molverhältnis von 1 : 12000 erreicht, bei dem die Aktivität der AK auf rund 90% des Ausgangswertes gesunken ist. Nimmt man an, daß der AK-Gehalt beim Anfälligen nur 1/3 des Gehaltes beim Nichtanfälligen ausmacht, so ergibt sich ein Molverhältnis von 1 : 36000, bei dem die Enzymaktivität auf weniger als 40% des Ausgangswertes gesunken ist.

Methoxyfluran: Bei normaler AK-Konzentration würde in der Muskelzelle ein Molverhältnis von 1 : 40000 erreicht, bei dem die Aktivität der AK auf 67% des Ausgangswertes gesunken ist. Nimmt man an, daß der AK-Gehalt beim Anfälligen nur 1/3 des Gehaltes beim Nichtanfälligen ausmacht, so ergibt sich ein Molverhältnis von 1 : 120 000, bei dem die Enzymaktivität auf weniger als 50% des Ausgangswertes gesunken ist.

Äther: Bei normaler AK-Konzentration würde im Muskel ein Molverhältnis (1 : 47 000) erreicht, bei dem die Enzymaktivität noch vollständig erhalten bleibt. Ebenfalls noch 100% des Ausgangswertes beträgt die AK-Aktivität, wenn man annimmt, daß der AK-Gehalt beim Anfälligen nur 1/3 des Gehaltes beim Nichtanfälligen ausmacht.

Leider wurden für Enfluran und Lachgas nicht die Daten gefunden, die das Molverhältnis im Muskel berechnen lassen.

4. ÜBERPRÜFUNG DER BINDUNG VON HALOTHAN AN DIE ADENYLATKINASE MIT HILFE DER FLUORESZENZ VON 1-ANILINONAPHTHALIN-8-SULFONSÄURE-MG-SALZ

4.1. Übersicht

Die Fluoreszenz von 1-Anilinonaphthalin-8-Sulfonsäure-Mg-Salz (ANS) wird durch die AK beträchtlich erhöht.

Wird die AK-Lösung zuvor mit Halothan versetzt, dann ist die Erhöhung der Fluoreszenz noch stärker.
Die Wirkung des Halothans ist reversibel.

4.2. Literatur

Eine Theorie, die den folgenden Versuchen zugrunde liegt, findet sich bei AUGUSTIN und HASSELBACH (3):

Sie verwendeten ANS wegen seiner Fluoreszenz, um die Vorgänge in der Proteinkomponente Sarkoplasmatischer Membranen zu erforschen, wenn auf diese die Anästhetika Halothan und Äther einwirken. ANS bindet sich dabei mit den hydrophoben Nischen. Die fluoreszierende ANS geht nämlich mit den Proteinen der Membran Bindungen ein, was durch eine Fluoreszenzänderung erkannt werden kann. Die Fluoreszenz wird erneut verändert, wenn ein Anästhetikum der Lösung zugefügt wird, die ANS und Protein enthält. Die Anästhetika greifen in die Proteinkomponente der Membran ein. Die Anästhetika befreiten dadurch das ANS aber nicht aus seinen Bindungsstellen in den Membranen, sondern veränderten die Umgebung des ANS.

AUGUSTIN und HASSELBACH nehmen nun an, daß die Anästhetika den Konformationszustand der Proteinkomponente von sarkoplasmatischen Membranen mit Unterbrechung der hydrophoben Region verändert, wobei allerdings die Struktur des Wassermantels um die Anästhetika zumindest teilweise für deren Wirkung verantwortlich sein soll.

4.3. Methode

Es wurde die Fluoreszenz von ANS bestimmt, und zwar von freiem ANS, von an AK gebundenem ANS und von ANS, das an einen AK-Halothan-Komplex gebunden war.

Notwendige Geräte:

Fluoreszenz Spektrophotometer: Perkin-Elmer MPF-3
Lampennetzgerät: Perkin-Elmer 150 Xenon Power Supply
Hitachi Recorder QPD 33

Reagenzien:

1.) 1-Anilinonaphthalin-8-Sulfonsäure-Mg-Salz, reinst
$(C_{16}H_{12}NSO_3)_2Mg.2H_2O$ Molmasse: 657,0
Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Best.Nr.: 13 649

2.) Adenylatkinase, AK, als Myokinase bezeichnet, aus Schweinemuskel
Suspension in 3,2 M Ammoniumsulfatlsg.
Boehringer 15 350 10 mg/2ml

3.) Fluothan (=Halothan), 2-Brom-2-chlor-1,1,1 - trifluoräthan
Imperial Chemical Industries Limited
Macclesfield, Cheshire, England

4.) Di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat
$Na_2HPO_4.2H_2O$ Molmasse: 177,99 g
Merck 6580

5.) Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat
$NaH_2PO_4.H_2O$ Molmasse: 137,99 g
Merck 6346

Herstellung der Lösungen:

1.) 0,1 n Phosphatpuffer, pH 7,45

2.) Die AK-Suspension wurde mit dem Phosphatpuffer auf 1/10 verdünnt.

0,02 ml dieser Lösung enthielten dann $4{,}762.10^{-10}$ Mol AK (Molmasse der AK: 21 000)

3.) 12,5 mg ANS wurden in 80 ml Puffer gelöst. 0,02 ml dieser Lsg. enthielt dann $4{,}762.10^{-9}$ Mol ANS Gleiche Mengen AK- und ANS-Lsg. ergaben also ein Molverhältnis von AK/ANS = 1/10.

4.) AK/Halothan-Komplex: Die AK/Puffer-Lösung von 2.) wurde mit Halothan unterschichtet und 1 Tag stehengelassen.

Inkubationsansatz:

Nach Zugabe von ANS-Lösung, AK-Lösung und AK/Halothan-Lösung wurde er mit Puffer immer auf 1 ml aufgefüllt.

4.4. Ergebnisse

1.) Die Eigenfrequenz des Puffers besaß ein Intensitätsmaximum bei 440 nm (siehe Tabelle **3**).

2.) Auch ein mit Halothan gesättigter Puffer zeigte dasselbe Spektrum (siehe Tabelle **4**).

3.) Auch die AK in verschiedener Konzentration beeinflußte die Eigenfrequenz des Puffers nicht (siehe Tabelle **5**).

4.) Selbst mit dem AK/Halothan-Komplex ergab sich keine Veränderung zu Versuch 1 (siehe Tabelle **6**).

5.) Das Fluoreszenzspektrum von ANS besaß bei verschiedenen ANS-Konzentrationen ein Intensitätsmaximum bei 516 nm (siehe Tabelle **7** und Abbildung **15**).

6.) War der Puffer mit Halothan gesättigt, dann verschob sich weder die Wellenlänge des Intensitätsmaximums der ANS-Fluoreszenz, noch veränderte sich die Intensität des Maximums gegenüber den Versuchen ohne Halothan (siehe Tabelle **8** und Abbildung **15**).

7.) Wurden AK und ANS vermischt, so veränderten sich die Intensität des Maximums und deren Wellenlänge folgendermaßen: Bis zu einem Molverhältnis 1/50 blieb die Wellenlänge konstant bei 510 nm. Stieg das Verhältnis weiter, so wurde die Wellenlänge des Maximums kleiner. Vom Molverhältnis 1/150 bis 1/60 fiel die Intensität des Maximums steil als vom Verhältnis 1/60 bis 1/10. Insgesamt waren die Intensitäten der ANS-Fluoreszenz wesentlich höher als deren Werte bei Abwesenheit von AK (siehe Tabelle **9** und Abbildung **15**).

8.) Bei wechselnden Molverhältnissen AK/ANS wurde der Einfluß von Halothan auf die Fluoreszenz des AK/ANS-Komplexes geprüft. Hier lagen die Werte der Intensitäten erheblich höher als die Werte bei Abwesenheit von Halothan. Auch die Wellenlängen wurden durch Halothan nach geringeren Werten hin verschoben. Bei diesem Versuch wur-

de der AK/Halothan-Komplex verwendet, der zu der ANS-Lösung gegeben wurde (siehe Tabelle *10* und Abbildung *15*).

9.) Nun konnte die Reversibilität des Halothaneinflusses auf die AK/ANS-Fluoreszenz überprüft werden. Zunächst mit einem AK/ANS-Molverhältnis von 1/10.

a) AK wurde zu ANS gegeben. Intensität und Wellenlänge des Maximums lagen bei 30 E bzw. 479 nm.

b) Wurde ein AK/Halothan-Komplex zu ANS gegeben, dann wuchs die Intensität auf 34 E, während die Wellenlänge sich nach einem kleineren Wert hin verschob: 476 nm. Danach wurden die AK-Puffer-Lösung aus Versuch a) und die AK-Halothan-Puffer-Lösung aus Versuch b) für zwei Stunden in einem Exsikkator dem Vakuum einer Wasserstrahlpumpe ausgesetzt und die Fluoreszenz, die sich dann ergab, in Versuch c) und d) gemessen.

Beide Male lagen die Wellenlängen bei 479 nm. Die Intensität von c) lag wie vorher in Versuch a) bei 30 E, die des AK/Halothan-Komplexes in b) war im Versuch d) auf 31 E gesunken (siehe Tabellen *11*).

10.) Es wurde die Reversibilität noch einmal geprüft. In den vorangegangenen Versuchen hatte sich das AK/ANS-Molverhältnis 1/50 als dasjenige erwiesen, bei dem unter Halothaneinfluß größere Veränderungen auftraten als bei den Molverhältnissen 1/40 und 1/10 (bei einer AK-Zugabe von 0,02 ml!). Die Ergebnisse des Versuches 9 wurden bestätigt: Der Einfluß von Halothan ist reversibel (siehe Tabellen *12*).

4.5. Tabellen

Für alle folgenden Tabellen gilt

Erregungswellenlänge : 380 nm
Emissionswellenlänge : 400-600 nm
Spaltbreiten : 10 nm
Inkubationszeit : 1 Min

Die Versuche wurden bei verschiedenen Geräteempfindlichkeiten gemessen (E = 1; 3; 10). Für die Tabellen wurden aber alle Intensitäten auf E = 1 umgerechnet.

Tabelle 3 Eigenfrequenz des Puffers

λ_{max} = 440 nm I_{max} = 2,1

Tabelle 4 Puffer mit Halothan gesättigt

λ_{max} = 441 nm I_{max} = 1,8

Tabelle 5 AK in Puffer

Versuch	1	2	3	4	5
AK/Puffer µl	20	40	60	80	100
Puffer µl	980	960	940	920	900
λ_{max}	440	440	440	440	440
I_{max}	2,3	2,1	2,2	2,4	2,0

Tabelle 6 AK in Puffer, gesättigt mit Halothan

Versuch	1	2
Puf/AK/Halothan	20	100
Puffer µl	980	900
λ_{max}	439	440
I_{max}	2,2	2,4

Tabelle 7 Die Fluoreszenz von ANS

Versuch	1	2	3	4	5
ANS µl	20	40	60	80	100
Puffer µl	980	960	940	920	900
λ_{max}	511	517	517	517	514
I_{max}	1,9	3,2	4,7	6,3	7,0

Tabelle 8 Die Fluoreszenz von ANS in Puffer mit Halothan

Versuch	1	2	3	4	5	6	7
ANS µl	20	40	60	80	100	100	100
Puffer µl	-	-	-	-	-	880	800
Puffer/Hal	980	960	940	920	900	20	100
λ_{max}	518	518	517	517	515	509	517
I_{max}	2,0	3,1	4,6	5,8	6,9	7,1	6,9

Tabelle 9 AK und ANS in Puffer je 20 µl AK/Puffer

Versuch	1	2	3	4	5
ANS µl	20	40	60	80	100
Puffer µl	960	940	920	900	880
λ_{max}	491	501	507	507	510
I_{max}	2,8	4,7	6,1	8,5	9,5

Versuch	6	7	8	9	10	11
ANS µl	120	140	160	180	200	300
Puffer µl	860	840	820	800	780	680
λ_{max}	508	509	509	511	513	509
I_{max}	11,8	12,3	13,6	14,1	15,2	19

Tabelle 10 AK und Halothan, ANS in Puffer
AK/Halothan/Puffer: je 20 µl

Versuch	1	2	3	4	5
ANS µl	20	40	60	80	100
Puffer µl	960	940	920	900	880
λ_{max}	484	488	495	501	497
I_{max}	3,9	5,9	8,9	10,3	12,4

Tabellen 11 zur Prüfung der Reversibilität der Bindung zwischen Halothan und AK

a.) AK, ANS, Puffer

Versuch	1	2	3	4	5	6	7
λ_{max}	473	479	480	477	482	482	481
I_{max}	33,9	29,9	29,8	29,9	29,0	27,4	27,8

$\overline{\lambda_{max}}$ = 479 nm $\overline{I_{max}}$ = 29,7

b.) AK, Halothan, ANS, Puffer

Versuch	1	2	3	4	5	6
λ_{max}	473	476	476	477	476	476
I_{max}	30,4	36,1	35,5	33,7	36,2	33,8

$\overline{\lambda_{max}}$ = 476 nm $\overline{I_{max}}$ = 34,3

c.) AK, ANS, Puffer, 2 h lang unter Wasserstrahlvakuum im Exsikkator

Versuch	1	2	3	4	5
λ_{max}	476	479	485	479	476
I_{max}	29,2	32,4	28,0	28,8	33,3

$\overline{\lambda_{max}}$ = 479 nm $\overline{I_{max}}$ = 30,3

d.) AK, Halothan, ANS, Puffer, 2 h lang unter Wasserstrahlvakuum im Exsikkator

Versuch	1	2	3	4	5
λ_{max}	477	478	484	480	480
I_{max}	32,0	33,7	29,9	30,7	30,5

Versuch	6	7	8	9	10
λ_{max}	479	480	479	479	477
I_{max}	30,4	32,0	30,1	29,9	30,5

$\overline{\lambda_{max}}$ = 479 nm $\overline{I_{max}}$ = 31,0

Für alle 4 Tabellen gilt:

AK/Puffer Mischung : 0,1 ml
AK/Halothan/Puffer Mischung : 0,1 ml
ANS/Puffer Mischung : 0,1 ml
Puffer : 0,8 ml

Tabellen 12 zur Prüfung der Reversibilität der Bindung zwischen Halothan und AK :

AK/Puffer Mischung : 0,02 ml
ANS/Puffer Mischung : 0,1 ml
AK/Puffer/Halothan Mischung : 0,02 ml
Puffer : 0,88 ml

a.) AK, ANS, Puffer

Versuch	1	2	3	4	5	6
λ_{max}	498	506	506	506	500	493
I_{max}	11,9	11,0	10,7	10,6	11,7	13,0

$\overline{\lambda_{max}}$ = 501 nm $\overline{I_{max}}$ = 11,5

b.) AK, Halothan, ANS, Puffer

Versuch	1	2	3	4	5	6
λ_{max}	500	490	493	496	500	500
I_{max}	13,0	12,6	12,8	12,5	11,4	11,9

$\overline{\lambda_{max}}$ = 497 nm $\overline{I_{max}}$ = 12,4

c.) AK, ANS, Puffer, 2 h lang unter Wasserstrahlvakuum im Exsikkator

Versuch	1	2	3	4	5	6
λ_{max}	500	503	495	499	502	502
I_{max}	11,8	11,6	12,0	13,0	11,6	10,3

$\overline{\lambda_{max}}$ = 500 nm $\overline{I_{max}}$ = 11,7

d.) AK, Halothan, ANS, Puffer, 2 h lang unter Wasserstrahlvakuum im Exsikkator

Versuch	1	2	3	4
λ_{max}	490	506	503	491
I_{max}	11,6	11,4	9,9	12,0

Versuch	5	6	7	8
λ_{max}	500	506	500	497
I_{max}	9,7	9,9	10,5	9,7

$\overline{\lambda_{max}}$ = 500 nm $\overline{I_{max}}$ = 10,6

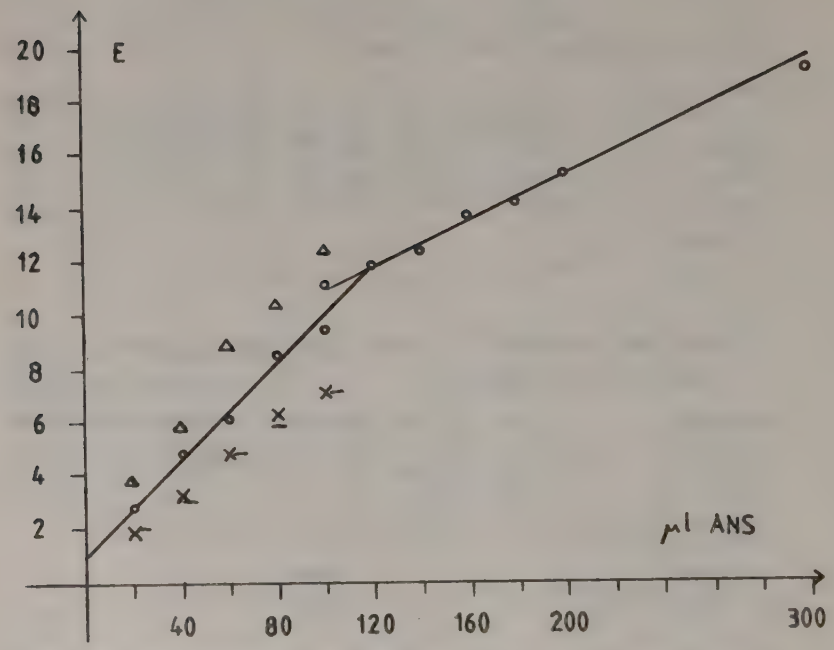


Abb. 15: Fluoreszenz von ANS in Abhängigkeit von seiner Konzentration

x = ANS (Ergebnisse 5) – = ANS+Hal (Erg 6)

Δ = ANS+AK (Erg 7) o = ANS+AK+Hal (Erg 8)

5. DISKUSSION

5.1. Diskussion der Versuche zur Inaktivierung der AK

1. Versuchsreihe: Inaktivierung der in Phys. NaCl-Lsg gelösten AK

Diese erste Versuchsreihe bestätigt die früher durchgeführten Versuche, daß die AK tatsächlich durch Anästhetika inaktiviert wird (37).

Da man unterschiedliche Affinitäten zwischen den Anästhetika und der AK annehmen muß, überrascht es nicht, daß bei gleichbleibender Inkubationszeit einige Anästhetika die AK bis unter 10% inaktivieren, andere nur bis 30 und 40% der Ausgangsaktivität.

Um diese unterschiedlichen Ergebnisse zu erklären, soll die Restaktivität mit den Löslichkeiten der Anästhetika in Wasser, mit ihren Verteilungskoeffizienten für Öl/Gas und ihren Molmassen verglichen werden. (Wie später gezeigt wird, befinden sich zwei hydrophobe Nischen im AK-Molekül. Diese stehen offensichtlich in enger Beziehung zum aktiven Zentrum und könnten Angriffsstellen für die inaktivierenden Anästhetika darstellen s.S. 82f).

Tab. 13

	Halothan	Enfluran	Methoxy-fluran	Äther	Lachgas
Lösl. in Wasser	450 mg/ 100ml H_2O	280 mg/ 100ml H_2O	220 mg/ 100ml H_2O	7500 mg/ 100ml H_2O	133 mg/ 100ml H_2O
VK Öl/Gas	224	98,5	825	50,2	1,40
Molmasse	197 g	184,5 g	165 g	74 g	44 g
Restak-tivität	10 %	30 %	40 %	10 %	30 %
niedrigster Meßwert	7 %	19 %	18 %	5 %	21 %

Die Prozentzahlen für die Restaktivität sind weder mit der Löslichkeit der Anästhetika in Wasser in Beziehung zu setzen, noch mit dem Verteilungskoeffizienten Öl/Gas, noch mit ihrer Molmasse, also primär unabhängig von diesen Werten. Die niedrigsten Meßwerte sind entweder einfach Streuwerte, die vom wahren Wert abweichen. Sie können aber auch darauf hindeuten, daß der wahre Wert tiefer liegt als der Mittelwert, und daß er nur nicht wegen meßtechnischer Ungenauigkeit erreicht worden ist. Dazu ist aber zu erwähnen, daß die beschriebene Arbeitsweise einschließlich Inkubationszeit und -temperatur genau eingehalten worden ist. So kann man davon ausgehen, daß es sich durchaus um eine statistische Streuung handelt.

Verlängert man die Inkubationszeit bei gleichem Molverhältnis, dann sinkt die Aktivität weiter ab. So muß man annehmen, daß mit genügend langer Inkubationszeit die AK bis auf 0% der Ausgangsaktivität inaktiviert sein wird.

3. Versuchsreihe: Die Wirkung von Serum auf die AK-Aktivität

Dieser Versuchsreihe kann entnommen werden, daß Serum die Ak stabilisiert. Denn nach derselben Inkubationszeit zeigte die in Serum gelöste AK eine höhere Restaktivität als die in Phys. NaCl-Lsg. gelöste AK. Dies stimmt mit der Beobachtung von BROWNSON und SPENCER überein, (13), die feststellten, daß Albumin die Aktivität der AK stabilisierte. Tatsächlich enthält das verwendete Serum rund 7g Gesamtprotein/100ml, wobei dieser Wert aber nicht weiter aufgeschlüsselt worden ist.

Diese Beobachtung zeigt doch deutlich, daß im Körper mit anderen Ergebnissen in Bezug auf die AK-Inaktivierung durch Anästhetika gerechnet werden muß.

2. Versuchsreihe: Die Wirkung der Anästhetika auf die AK-Aktivität im Serum

Da in diesen Versuchen die AK trotz der Inkubationszeit von 15 Min nur wenige Prozente ihrer Ausgangsaktivität verloren hat, bestätigen diese Ergebnisse, daß das verwendete Serum die AK stabilisiert. Außerdem wird gezeigt, daß man eine viel höhere Konzentration an Anästhetika braucht, um die AK-Aktivität dennoch nur recht bescheiden zu dämpfen. In der Literatur wurde nun kein Hinweis dafür gefunden, ob die AK auch an ihrem Wirkungsort im Cytoplasma bzw. im äußeren Mitochondrienkompartiment stabilisiert wird. Die Möglichkeit besteht, da sich intrazellulär Proteine befinden, da außerdem die Mitochondrienmembran eine solche Stabilisierungsfunktion haben könnte. Dabei muß aber bedacht werden, daß die AK zu den am leichtesten aus den Mitochondrien extrahierbaren Enzymen gehört (59).

Molverhältnisse AK/Anästhetika im Muskel

Die Ergebnisse aus diesem Kapitel scheinen zunächst hervorragend die Hypothese zu unterstützen, daß einige Anästhetika (Halothan und Methoxyfluran) die Muskel-AK bis zu einem physiologisch unwirksamen Rest inaktivieren und somit die Entwicklung der MH einleiten. Um aber diese Ergebnisse richtig bewerten zu können, müssen die folgenden Überlegungen berücksichtigt werden:

a) Der Muskel ist nicht, wie in den Berechnungen zugrunde gelegt, an Anästhetikum gesättigt. Infolgedessen verändert sich das Molverhältnis AK/Anästhetikum zugunsten der AK, was bedeutet, daß das vorhandene Anästhetikum zu gering konzentriert ist, um die AK zu inaktivieren.

b) Die Versuche wurden bei 25°C in Phys. NaCl-Lsg. durchgeführt. Damit ist nicht beantwortet, wie sich AK und Anästhetika bei Körpertemperatur und im Muskelgewebe verhalten. Die AK könnte ja bei 37°C gegenüber MH auslösenden Chemikalien besonders instabil sein. Die Versuche

konnten also nur zeigen, daß die Anästhetika grundsätzlich in der Lage sind, die AK zu inaktivieren.

c) Für die Versuche wurde Schweinemuskel-AK verwendet. Obwohl es sich hierbei um dasselbe Enzym handelt, bestehen Unterschiede zwischen Schweine- und Menschen-AK, die sich im Molekulargewicht, in der Anzahl der Aminosäuren und der Anzahl bestimmter Aminosäuren äußert (49). Dies ruft möglicherweise Unterschiede in der spezifischen Aktivität und in der Affinität zu den Anästhetika hervor. Auch muß bedacht werden, im Hinblick auf die hier bearbeitete Fragestellung, daß möglicherweise die Schweine-MH und die Menschen-MH nicht identisch sind (10).

Die Bedeutung der Stoffwechselveränderungen bei der Entwicklung der MH

Da durch die vorliegenden Versuchsergebnisse keine Entscheidung für oder gegen die AK-Defizienz-Hypothese getroffen werden konnten, sollen weitere Überlegungen diskutiert werden: Der grundlegende Unterschied zwischen der Membrandefekt-Hypothese und der Tübinger AK-Defizienz-Hypothese ist der Ausgangspunkt dieser Hypothesen selbst: Für die Membrandefekt-Hypothese würden zweifelsohne Befunde einer präoperativ defekten Membran sprechen. Präoperative Myopathien allein, wie sie mehrfach erwähnt werden (56, 33), unterstützen beide Hypothesen. Nach begonnener Narkose müßte nach der AK-Defizienz-Hypothese als erste intrazelluläre Veränderung das Gleichgewicht der Adeninnucleotide zusammenbrechen. In Verbindung mit diesem Vorgang, aber daran anschließend, würden dieselben Stoffwechselveränderungen eintreten, wie sie auch nach der Membrandefekt-Hypothese zu finden sind. Die Reihenfolge dieser Stoffwechselveränderungen intrazellulär, aber auch später im Serum wird deshalb keine ausschlaggebende Bedeutung bei der Beurteilung der vorgestellten Hypothesen erlangen.

Dagegen wird eine frühzeitige Beobachtung des intrazellulären ATP-Abfalls verbunden mit einem Anstieg seiner Spaltprodukte, v.a. ADP, die AK-Defizienz-Hypothese unterstützen. Tatsächlich finden sich in der Literatur zahlreiche Hinweise über einen starken Abfall des ATP-Gehaltes im MH-Muskel, wobei auch mehrere Male über das frühe zeitliche Auftreten dieser Adeninsystem-Veränderung berichtet wird (s.S.13f).

Organbefall der Krankheit im Hinblick auf die Organverteilung der AK

Im Zusammenhang mit der hier diskutierten Frage nach der Pathogenese der MH sind noch weitere Überlegungen aufgetaucht: Die AK als ein äußerst wichtiges Enzym für den Energiestoffwechsel kommt ja nicht nur in der Skelettmuskulatur vor, sondern auch in der Herzmuskulatur, der Leber, den Erythrocyten und in anderen Organen (49, 42). Nach der AK-Defizienz-Hypothese müßten auch diese anderen Organe von der Stoffwechselentgleisung bei der MH betroffen sein. Dazu schreibt BRITT, daß die Myopathie bei Menschen-MH auch den Herzmuskel betreffen könnte, worauf Arrhythmien hindeuten sollen (9). LUCKE et al. sind allerdings der Meinung, daß aufgrund des erheblich gesteigerten Herzzeitvolumens während der MH-Krise eine zugrunde liegende Myopathie des Herzens unwahrscheinlich ist (43). Was die Leber betrifft, so muß bedacht werden, daß sich in ihr die AK im äußeren Kompartiment der Mitochondrien befindet, so daß sie für ein Anästhetikum schwerer zu erreichen ist als die AK im Cytoplasma der Muskelzelle. Tatsächlich wurde in der MH-Literatur nichts über eine Leberschädigung gefunden. Zudem muß bedacht werden, daß in den verschiedenen Organen verschiedene Isoenzyme gefunden werden, die verschieden starke Affinitäten zu den Anästhetika aufweisen können (41, 49, 13, 19).

Problem der Vererbung

Um bei der Prüfung der Tübinger Hypothese einen weiteren Gesichtspunkt anzuführen, kann man noch untersuchen, wie es mit der Vererbung von MH und AK steht. Die MH wird autosomal dominant vererbt (8). Enzyme werden rezessiv vererbt, da das gesunde Gen genügend Enzyme bereitstellt und somit heterozygote Träger eines mutierten Gens meist symptomfrei sind (46). Dies widerspricht aber nicht der Tübinger Hypothese. Denn Merkmalsträger der MH leben symptomfrei bzw. symptomarm. Erst Anästhetika lösen eine MH-Krise aus, wodurch die Dominanz eines rezessiven Erbleidens vorgetäuscht werden kann. Denn im Falle der Tübinger Hypothese hätte der Nichtanfällige immer noch genügend AK, der Merkmalsträger aber fast gar keine mehr, wodurch das Rezessive "dominant" wird.

War der Tübinger Befund ein Zufallsbefund?

Die bisher durchgeführten Überlegungen beweisen die AK-Defizienz-Hypothese nicht, sie schließen sie aber auch nicht aus. Ihre Entstehung verdankt aber diese Hypothese v.a. auch den Befunden an der Tübinger Universität, über die in der Einleitung berichtet wurde, und wonach in einer betroffenen Familie tatsächlich zwei Personen eine AK-Defizienz aufweisen. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß es sich hierbei um einen Zufallsbefund handelt. Denn bei anfälligen Individuen besteht oft eine unscheinbare präoperative Myopathie (56, 33). In dieser Familie besteht vielleicht ebenfalls eine bisher unerkannte Myopathie, die mit einem verminderten AK-Gehalt des Muskels einhergeht, der aber vielleicht nichts mit der primären Ursache der MH zu tun hat.

Mehrfachursache für die MH

Falls aber diesem Befund an der Tübinger Universität doch Bedeutung eingeräumt werden soll, muß die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß eine Inhibition der AK eine

von mehreren Ursachen für die MH sein kann, die das Krankheitsbild auslösen, wenn sie zusammentreffen. Diese Überlegung ist berechtigt, denn erstens tritt die MH in mehreren Formen auf (44), und zweitens ist sie mit einer Vielzahl von Myopathien verbunden, die sich von Familie zu Familie unterscheiden können (33). Z.B. könnten aufgrund einer Veranlagung zu MH durch eine defekte Zellmembran mehr Anästhetika ins Innere der Muskelzelle diffundieren als bei Nichtanfälligen. So könnte schließlich im Zellinnern doch eine solche Anästhetikum-Konzentration entstehen, daß das geforderte Molverhältnis AK / Anästhetikum erreicht wird und nun eine Inaktivierung der AK zur Ausbildung des MH-Krankheitsbildes beitragen kann.

Könnten Anästhetikaabbauprodukte als AK-Inhibitoren wirken?

Ist es nicht möglich, daß Abbauprodukte der Anästhetika die AK angreifen (bzw. Enzyme oder die Zellwand angreifen, wenn man die Frage erweitern will)? Dazu ist aber zu sagen, daß sich der größte Teil des Anästhetikum-Stoffwechsels in der Leber und während der postnarkotischen Periode abspielt (58), also in der Zeit, in der die MH schon längst begonnen hat. Dann wäre es auch durchaus denkbar, daß sich die Erscheinungen der MH besonders stark in der Leber zeigen. Man müßte einen verstärkten intrazellulären Metabolismus der Anästhetika annehmen, wodurch man aber zu sehr ins Spekulieren kommt.

5.2. Diskussion der Versuche Fluoreszenzspektroskopie

Vergleich der Versuche mit denen von AUGUSTIN und HASSELBACH (3)

Es wurde hier nur das Emissionsspektrum bestimmt, wobei aber einige Unterschiede zu den Ergebnissen von AUGUSTIN und HASSELBACH auftauchten:

a) Die Intensitätsmaxima von ANS in Puffer stimmen gut überein (hier: 516nm, AUGUSTIN: 518nm)

b) ANS + Puffer + Halothan: Bei den eigenen Versuchen blieben Intensität und Wellenlänge des Maximums durch Halothan unbeeinflußt, während AUGUSTIN eine Fluoreszenzerhöhung um ungefähr 20% fand.

c) Beide finden eine Erhöhung der maximalen Intensität, außerdem verschiebt sich das Maximum in beiden Fällen nach geringeren Wellenlängen, wenn ANS und Proteine zusammengegeben werden.

d) Kommt zu der ANS-Proteinmischung nun Halothan hinzu, so war hier eine weitere Intensitätssteigerung und eine noch stärkere Verschiebung des Maximums nach geringeren Wellenlängen zu beobachten, als bei Abwesenheit von Halothan. AUGUSTIN hingegen berichtet von einer beträchtlichen Verminderung der Fluoreszenz des membrangebundenen ANS, wenn Anästhetika hinzugegeben werden.

Worauf beruhen diese Unterschiede?

a) AUGUSTIN führte seine Versuche einerseits mit der gesamten Membran durch, die verschiedene Proteine und Lipide enthält, andererseits benützte er dieselbe Membran, von der er aber die Lipidanteile entfernt hatte, so daß verschiedene Membranproteine übriggeblieben waren.

b) Der pH-Wert der hier verwendeten Pufferlösung betrug 7,45, während der von den AUGUSTIN'schen Versuchen 6,5 betrug.

c) Unterschiedlich waren auch die Zusammensetzungen der Lösungen, z.B. die unterschiedliche Molarität der Puffer. AUGUSTIN benützte außerdem als zusätzliche Salze KCl und $MgCl_2$.

Die verschiedenen Proteine, die unterschiedliche Zusammensetzung der Lösungen und die unterschiedlichen pH-Werte beeinflussen bestimmt die Ergebnisse, da sich die physikalisch-chemischen Verhältnisse auf die wichtige hydrophobe Nische des Proteins auswirken können und somit vielleicht eine Konformationsänderung herbeiführen können (3, 69). Die unterschiedliche Wirkung des Halothan auf ANS in Puffer könnte nur auf den unterschiedlichen pH-Wert, auf die Molarität des Puffers und auf die Zusammensetzung der Lösung zurückzuführen sein.

Welche Schlüsse lassen die Ergebnisse zu?

Halothan mit ANS allein im Puffer führt zu keiner Fluoreszenzänderung. AK, zu ANS gegeben, verändert die Intensität des Maximums. Die Wellenlänge des Maximums verändert sich dann ebenfalls ab einem bestimmten Molverhältnis. Wird zu der AK-ANS-Mischung noch Halothan gegeben, dann werden die Werte der Fluoreszenz noch einmal verändert. Daraus ergibt sich, daß ANS von der AK stark beeinflußt wird, wahrscheinlich eine Bindung eingeht.

Halothan beeinflußt das ANS nur, wenn es an die AK gekoppelt ist. Dieser Effekt könnte auf eine Bindung des Halothan an die AK zurückzuführen sein, was zunächst zur Konformationsänderung der AK und damit zur Veränderung der hydrophoben Nische führt, an der ANS gebunden ist. Dadurch ändert sich schließlich die Fluoreszenz des ANS (3). Eine weitere Erklärung wäre, daß die Hydratationsschale des Halothans die aromatischen Ringe des AK-ge-

bundenen ANS beeinflussen könnte (3). Dagegen spricht, daß Halothan das in Puffer gelöste ANS nicht beeinflußt, sondern nur die Fluoreszenz der Kombination AK-ANS. Dagegen spricht auch, daß die Bindung von ANS und von Halothan nicht genau an derselben Stelle geschehen soll (3).

Eine neuere Arbeit von SACHSENHEIMER et al. (60) bestätigt, daß Halothan tatsächlich eine Bindung mit der AK eingeht,und zwar an der spezifischen Bindungsstelle des Adeninteils von AMP.

Widersprüche zwischen den Versuchen über Fluoreszenzspektroskopie und denen über die Aktivitätsbestimmungen

Die Molverhältnisse, bei denen das Halothan die Fluoreszenzveränderungen hervorruft, liegen im Bereich AK / Halothan = 1 : 10 bis 1 : 200. Vergleicht man diese Molverhältnisse mit denen, bei denen eine AK-Inaktivierung eintritt, (1 : 10^5 bis 1 : 10^6), so fallen die Unterschiede stark ins Auge.

Nimmt man an, durch Halothan findet eine Konformationsänderung der AK im Bereich 1 : 100 statt, dann bedeutet dies, daß durch diese Konformationsänderung die Enzymaktivität nicht beeinflußt wird. Das ANS, dessen Fluoreszenz ja verändert wird, könnte außerhalb des aktiven Zentrums des Enzyms gebunden sein.

Dagegen sprechen aber die Ergebnisse von SCHULZ et al. (65).Sie untersuchten die dreidimmensionale Struktur der AK und entdeckten dabei zwei hydrophobe Nischen. Die eine zwischen Gly 20 und Val 179, die andere zwischen Gly 94 und Tyr 153. Es sei geometrisch möglich, die eine mit dem Adeninteil von AMP zu füllen, die zweite mit dem von ATP und zwar so, daß das Phosphat von AMP und die gamma-Phosphorylgruppe von ATP sich treffen zwischen His 36 und einem zweiwertigen Metallion bei Asp 93.

Die Gegend um His 36 sei außerdem sehr auffallend: Cys 25 sei 5 Å weit weg. So ein His-Cys-Paar komme wahrscheinlich auch im aktiven Zentrum von CK und von der NaK-ATPase vor.

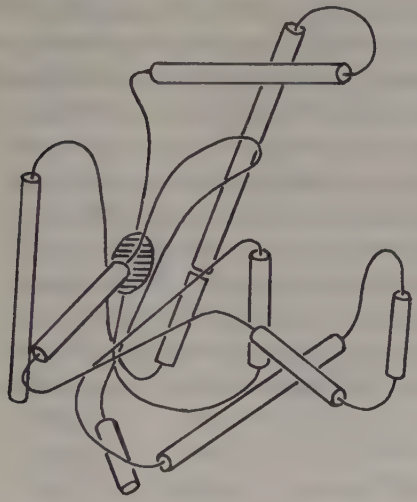


Abb. 16
Skizze der AK mit einem gebundenen Halothanmolekül (straffierte Ellipse). Die α-Helices sind als Zylinder gezeichnet. Halothan wird in einer hydrophoben Nische gebunden, die als Bindungsstelle des Adeninteils von AMP identifiziert ist.

Nach SACHSENHEIMER et al. (60)

Wenn Anästhetika die Konformation dieser hydrophoben Nischen verändern sollten, dann könnte das durchaus die Aktivität des Enzyms beeinflussen, da diese Stellen offensichtlich in enger Beziehung stehen zum aktiven Zentrum. Denn die Konformationsänderung hat Einfluß auf die hydrophoben Nischen, also auf die Polarität. Und die Polarität des aktiven Zentrums von Enzymen ist bedeutsam für die Bindung von Substrat und Cofaktor, aber auch für den katalytischen Vorgang selbst (69).

So kommt man zu dem Schluß, daß die Wirkung des Halothans auf die Fluoreszenzänderung des AK-gebundenen ANS nichts zu tun hat mit der Inaktivierung der AK.
Für die Fragestellung dieser Arbeit geben diese Versuche also nur insofern eine Antwort, als sie zeigen, daß die Anästhetika, also hier das Halothan, an der AK einen Einfluß ausüben, schon lange bevor die AK durch sie inaktiviert wird.

5.3. Diskussion der Versuche zur Reversibilität

Die AK hat ihre Aktivität nicht wiedererlangt in den Versuchen, zumindest nicht vollständig. Während der Zeit, in der das Anästhetikum die Lösung verlassen sollte, sanken sowohl die Aktivität in der Vergleichslösung als auch die in der Inkubationslösung. In vielen Fällen erreichte die Aktivität in den Küvetten schließlich so niedrige Werte, daß sie mit der angewandten Methode gerade noch gemessen werden konnten. Insgesamt mußte mit einem recht geringen Molverhältnis AK : Anästhetika und damit auch mit niedrigen Aktivitäten gearbeitet werden, damit sich die Werte der Inkubationslösung erkennbar unterschieden von den Werten der Vergleichslösungen. Dennoch sind einigermaßen sichere Aussagen zu machen. In einigen Fällen stiegen die Aktivitäten der Inkubationslösungen bezogen auf die Vergleichslösungen wieder etwas an, erreichten aber deren Werte nicht wieder. Oft blieben die Werte im Vergleich zu den Vergleichslösungen einigermaßen gleich. Einige andere Male sanken sie stärker als die Werte der Vergleichslösungen. Letzteres liegt mit Sicherheit daran, daß die Anästhetika nicht sofort wieder aus den Inkubationslösungen verschwunden waren, sondern noch eine Zeit lang während ihrer Austreibung fortwirken konnten.

Diese Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen stehen aber scheinbar im Gegensatz zu denjenigen, die mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie gewonnen wurden. Letztere haben gezeigt, daß der Effekt der Anästhetika auf das AK-gebundene ANS reversibel ist. Zum selben Ergebnis gelangen auch AUGUSTIN und HASSELBACH (3). Es stellt sich die Frage, haben die Ergebnisse der beiden Versuche überhaupt etwas miteinander zu tun?

Schon die gewonnenen unterschiedlichen Molverhältnisse deuten darauf hin, daß zwei verschiedene Wechselwirkungen zwischen Anästhetikum und AK untersucht worden sind.

Dieser Gedanke wird voll unterstützt durch die Bestimmungen der Reversibilität: Der Einfluß des Anästhetikums auf die AK-ANS-Fluoreszenz ist reversibel, Inaktivierung der AK durch die Anästhetika ist nicht reversibel.

Die Versuche der Aktivitätsbestimmungen lassen den Schluß zu, daß die AK durch Anästhetika irreversibel geschädigt wird. Wenn nun die MH tatsächlich durch Inaktivierung der AK verursacht werden soll, dann würde das mit der Beobachtung übereinstimmen, daß die MH nicht mehr aufzuhalten ist, wenn sie einmal in Gang gekommen ist. Rückzug des auslösenden Agens kann nicht mehr die Hypertherme Antwort verhindern (43). Dennoch überleben 35% der Betroffenen (6). Ihr Krankheitsbild war aber so schwerwiegend, so daß sie Zeit zur Genesung brauchen. Denn Genesung und damit die Reparatur der entstandenen Schäden kann erst beginnen, wenn wieder genügend AK gebildet worden ist.

6. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNG

Aufgrund von Untersuchungen einer Familie, aus der zwei Geschwister an Maligner Hyperthermie verstorben sind, entstand in Tübingen folgende Hypothese: Diesem Krankheitsbild liegt ein angeborener Mangel an Adenylatkinase (AK) zugrunde. Er kann normalerweise kompensiert werden. Aber die Einwirkung inhibierender Substanzen kann die Restaktivität der AK so stark vermindern, daß eine folgenschwere Stoffwechselentgleisung eintritt, die als MH bezeichnet wird.

Diese Arbeit bestätigt, daß die Anästhetika Halothan, Enfluran, Methoxyfluran, Äther und Lachgas die AK in vitro in Physiologischer NaCl-Lösung inaktivieren. Die Inaktivierung ist nicht reversibel. Serum stabilisiert die AK, so daß sie in Serum von keinem der Anästhetika weiter als bis 80% der Ausgangsaktivität inaktiviert wurde. Alle Versuche wurden mit Schweinemuskel-AK bei einer Temperatur von 25°C durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug 15 Min. Die inaktivierenden Molverhältnisse AK/Anästhetika liegen in dem Bereich $1:10^4$ bis $1:10^7$.

Diese Ergebnisse wurden mit den aus Literaturangaben errechneten erreichbaren Molverhältnissen AK/Anästhetika im Muskel verglichen. Bei Sättigung des Muskelgewebes an den Anästhetika Halothan und Methoxyfluran können tatsächlich Molverhältnisse erreicht werden, die zu einer Teilinaktivierung der AK führen. Durch Äther ist eine Inaktivierung unter diesen Bedingungen nicht zu erreichen. Im letzten Teil der Arbeit wurde mit Hilfe der Fluoreszenz-Spektrophotometrie gefunden, daß Halothan die Konformation der AK verändert. Diese Konformationsänderung bewirkt aber keine AK-Inaktivierung, da Konformationsänderung und Inaktivierung in verschiedenen Bereichen des Molverhältnisses AK/Anästhetika stattfinden.

Diese Ergebnisse können eine Pathogenese der MH nach der hier diskutierten AK-Defizienz-Hypothese nicht beweisen, denn es ist nicht sicher, ob die erforderlichen Molverhältnisse AK/Anästhetika im Muskel während einer Narkose tatsächlich erreicht werden. Andererseits kann diese Hypothese nicht ausgeschlossen werden, denn es sind weder die tatsächlichen Molverhältnisse AK/Anästhetika am Wirkort der AK bekannt, noch sind die in diesen Versuchen erworbenen Ergebnisse ohne weiteres auf eine Körpertemperatur von 37°C übertragbar. Die Möglichkeit einer Stabilisierung der AK durch Membranen bzw. durch intrazelluläre Proteine machen die vorliegende Problematik noch undurchsichtiger.

Um einer Lösung dieser Problematik näher zu kommen, sei vorgeschlagen, ähnliche Versuche bei einer Temperatur von 37°C durchzuführen und dabei als Lösungsmittel ein Muskelhomogenisat zu benützen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1 ATKINSON, D.E.: Biological Feedback Control at the Molecular Level. Interaction between metabolite-modulated enzymes seems to be a major factor in metabolic regulation
Science, Vol. 150, 851 - 857, (1965)

2 ATKINSON, D.E. und WALTON, G.M.: Adenosine Triphosphate Conservation in metabolic Regulation.
J. of biolog. Chem. 242, 3239-3241, (1967)

3 AUGUSTIN, J. und HASSELBACH, W.: Changes of the Fluorescence of 1-Anilino-8-naphthalenesulfonate, Associated with the Membranes of the Sarcoplasmic Reticulum, Induced by General Anesthetics
Eur. J. Biochem., 39, 75-84, (1973)

4 BERGHÄUSER, J.: A reactive Arginin in Adenylate Kinase
Biochimica et Biophysica Acta, 397, 370-376, (1975)

5 BERGMEYER, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse, 3. Aufl.
Bd. I 329- 338
Bd. II 2178-2181
Weinheim/Bergstr.
Verlag Chemie 1974

6 BERNHARDT, D. und SCHILLER, H.: Maligne Hyperthermie in Allgemeinanästhesie. Abnorme histochemische und elektronenoptische Muskelbefunde in Kombination mit pathologischen Serum-CPK-Werten als Beweis für das Vorliegen einer primären Myopathie
Anaesthesist 22, 367-372, (1973)

7 BRDICZKA, D., PETTE, D., BRUNNER, G. und MILLER, F.: Kompartimentierte Verteilung von Enzymen in Rattenlebermitochondrien. J. Biochem. 5, 294-304, (1968)

8 BRITT, B.A.: Recent advances in Malignant Hyperthermia Anesth. Analg. Curr. Res. 51. 841-850, (1972)

9 BRITT, B.A.: Malignant Hyperthermia: A pharmacognetic Disease of skeletal and cardiac Muscle N.Engl. J. Med., 240, 1140-1147, (1974)

10 BRITT, B.A., ENDRENYI, L. und CADMAN, D.L.: Calcium uptake into muscle of pigs susceptible to Malignant Hyperthermia: In vitro and in vitro studies with and without Halothan Brit. J. Anaesth. 47. 650-653, (1975)

11 BRITT, B.A., ENDRENYI, L., CADMAN, D.L., FAN, HO MAN und FUNG, H.Y-K.: Porcine Malignant Hyperthermia: Effects of Halothan on Mitochondrial Respiration and Calcium Accumulation Anesthesiology 42, 292-300, (1975)

12 BRITT, B.A., KALOW, W., GORDON, A., HUMPHREY, J.G. und REWCASTLE, N.B.: Malignant Hyperthermia: An Investigation of five Patients: Canad. Anaesth. Soc. J. 20, 432-467, (1973)

13 BROWNSON, C. und SPENCER, N.: Partial Purification and Properties of the two Common Inherited Forms of Human Erythrocyte Adenylate kinase Biochem. J. 130, 797-803, (1972)

14 BROWNSON, C. und SPENCER, N.: Kinetic studies on the Two Common Inherited Forms of Human Erythrocyte Adenylate Kinase. Biochem. J. 130, 805-811, (1972)

15 BUDDECKE, E.: Grundriß der Biochemie, 3. Aufl., Berlin, NY., Verlag Walter de Gruyter, (1973)

16 CAROPRESO, P.R.: Malignant Hyperthermia associated with Enflurane Anesthesia. Arch. Surg. 110, 1491-1498, (1975)

17 CLARK, M.G., WILLIAMS, C.H., PFEIFER, W.F., BLOXHAM, D.P., HOLLAND, P.C., TAYLOR, C.A. and LARDY, H.A.: Accelerated substrate cycling of fructose-6-phosphat in the muscle of malignant Hyperthermic pigs. Nature (Lond.), 245, 99-101, (1973)

18 COHEN, E.N., TRUDELL, J.R., EDMUNDS, H.N. und WATSON, E.: Urinary Metabolites of Halothane in Man Anesthesiology, 43, 392-401, (1975)

19 CRISS, W.E.: Rat Liver Adenosine Triphosphate Adenosin-monophosphate: Phosphotransferase Activity. II. Subcellular Localization of Adenylate Kinase Isozymes. J. of biolog. Chem. 245, 6352-6356, (1970)

20 DEUTSCHE ABBOTT GMBH, 6507 Ingelheim am Rhein Briefliche Auskunft

21 MC DONALD, G.G. und COHN, M.: Proton magnetic resonance spectra of porcine muscle AK and substrate complexes J. of biolog. Chem. 250, 6947-6957, (1975)

22 EHEHALT, V.: Fehler und Gefahren. Fallbericht einer frühzeitig erkannten "Malignen Hyperthermie" Anaesthesist 22, 377-378, (1973)

23 ELLIS, R.: Malignant Hyperpyrexia induced by Nitrous Oxide and treated with Dexamethasone British Medical Journal 4, 270-277, (1974)

24 DEUTSCHE ABBOTT GMBH, 6507 Ingelheim am Rhein: Ethrane, Inhalationsanästhetikum

25 ICI PHARMA, ARZNEIMITTELWERK PLANKSTADT, NIEDERLASSUNG DER DEUTSCHEN ICI GMBH: Fluothane 1974

26 FUCHS, F.: Thermal Inactivation of the Calcium Regulatory Mechanism of Human Skeletal Muscle Actomyosin: A possible Contributing Factor in the Rigidity of Malignant Hyperthermia Anesthesiology 42, 584-589, (1970)

27 GRONERT, G.A. und THEYE, R.A.: Halothane-induced Porcine Malignant Hyperthermia: Metabolic and hemodynamic changes Anesthesiology 44 36-43, (1976)

28 HALL, G.M., BENDALL, J.R., LUCKE, J.N. und LISTER, D.: Porcine Malignant Hyperthermia. II: Heat Production Brit.J.Anaesth. 48, 305-308, (1976)

29 HARRISON, G.G., SAUNDERS, S.J., BIEBUYCK, J.F., HICKMAN, R., DENT, D.M., WEAVER, V. und TERBLANCHE, J.: Anaesthetic-induced Malignant Hyperpyrexia and a Method for its Prediction Brit. J. Anaesth. 41, 844-855, (1969)

30 HASLAM, R.J. und MILLS, D.C.B.: The Adenylate Kinase of Human Plasma, Erythrocytes and Platelets in Relation to the Degradation of Adenosine Diphosphat in Plasma
Biochem. J., 103, 773-783, (1967)

31 HEYCK, H., LAUDAHN, G. und LÜDERS, C.J.: Fermentaktivitätsbestimmungen in der gesunden menschlichen Muskulatur und bei Myopathien.
II. Mitteilung: Enzymaktivitätsveränderungen im Muskel bei Dystrophia musculorum progressiva
Klinische Wochenschrift, 41, 500-509, (1963)

32 INNES, R.K.R. und STRØMME, J.H.: Rise in Serum CPK associated with agents used in Anaesthesia
Brit. J. Anaesth., 45, 185-190, (1973)

33 ISAACS, H. und HEFFRON, J.J.A.: Morphological and biochemical defects in muscles of human carriers of the Malignant Hyperthermia Sydrome
Brit. J. Anaesth. 47, 475-481, (1975)

34 ISAACS, H., HEFFRON, J.J.A. und BADENHORST, M.: Predictive Tests for Malignant Hyperthermia
Brit. J. Anaesth., 47, 1075-1080, (1975)

35 JONES, E.W., NELSON, T.E., ANDERSON, I.L., KERR, D.D. und BURNAP, T.K.: Malignant Hyperthermia of Swine
Anesthesiology 36, 42-51, (1972)

36 DE JONG, R.H., HEAVNER, J.E. und AMORY, D.W.: Malignant Hyperpyrexia in the Cat
Anesthesiology 41, 608-609, (1974)

37 JUNGER, H., HELLER, W., SCHMIDT, K., KUHNLE, P. und SCHORER, R.: Adenylatkinase Defizienz als Ursache der Malignen Hyperthermie unter Halothannarkose. In: E. Ringheimer (Hrsg) Kongressbericht, Jahrestagung der DGAW vom 2.-5. Oktober 1974, Perimed Erlangen, S. 1228-1232

38 KATZ, J.D., M.D.: MH during regional anaesthesia Anesthesiology 47, 75, (1977)

39 KERR, D.D., WINGARD, D.W. und GATZ, E.E.: Prevention of Porcine Malignant Hypertermia by Epidural Block Anesthesiology 42, 307-311, (1975)

40 LARSON, C.P., EGER, E.J. und SEVERINGHAUS, J.W.: The Solubility of Halothane in Blood and Tissue Homogenates Anesthesiology 23, 349-355, (1962)

41 LAUDAHN, G. und HEYCK, H.: Fermentaktivitätsbestimmungen in der gesunden menschlichen Muskulatur und bei Myopathien. I. Mitteilung: Enzymmuster und intracelluläre Verteilung von Enzymen im gesunden Skelettmuskel Kli Wo, 41, 493-500, (1963)

42 LEHMANN, F.G.: Die enzymatische Diagnostik des Herzinfarktes, II. Mitteilung: Die Bestimmung von organspezifischen Enzymen: Kreatinphosphokinase und Myokinase Enzym. biol. clin., 6, 36-43, (1966)

43 LUCKE, J.N., HALL, G.M. und LISTER, D.: Porcine Malignant Hyperthermia. I: Metabolic and Physiological Changes Brit. J. Anaesth. 48, 297-304, (1976)

43 LUCKE, J.N., HALL, G.M. und LISTER, D.: Porcine Malignant Hyperthermia.
I: Metabolic and Physiological Changes
Brit. J. Anaesth. 48, 297-304, (1976)

44 MENZEL, H., GULLOTTA, F., HELPAP, B. und FREIBERGER, K.: Bericht über zwei Fälle von Maligner Hyperthermie mit unterschiedlichem Verlauf
Z. für Pr. An. u. Wiederbelebung, 10, 227-235, (1975)

45 MOGENSEN, J.V., MISFELDT, B.B. und HANEL, H.K.: Preoperative exitement a.M.H.
The Lancet 1974, I, 1, 461

46 MURKEN, J.D. und CLEVE, H.: Humangenetik, S 3f
Stuttgart, Enke Verlag, (1975)

47 NELSON, T.E., BEDELL, D.M. und JONES, E.W.: Porcine Malignant Hyperthermia: Effects of Temperature and extracellular Calcium-Concentration on Halothane-induced Contracture of susceptible Skeletal Muscle
Anesthesiology 42, 301-306, (1975)

48 NELSON, T.E., JONES, E.W., VENABLE, J.H. und KERR, D.D.: Malignant Hyperthermia of Poland China Swine:
Studies of myogenic etiology
Anesthesiology 36, 52-56, (1972)

49 NODA, L.: Adenylate Kinase
Aus: The Enzymes, Bd. 8, Part A, 279-305,
Academic Press, London, NY,
3. Auflage, (1973)

50 DEUTSCHE ABBOTT GMBH, 6507 Ingelheim am Rhein: Penthrane, Methoxyfluran Abbott, Inhalationsanästhetikum

51 PRADET, A. und BOMSEL, J.L.: Physiologie végétale. - Contrôle in vivo des nucléotides adényliques par l'adénylate kinase. Comptes rendues hébdomadaires des séances de l'acadêmie des sciences Série D, Paris, 266, 2416-2418, (1968)

52 PRADHAN, T.K. und CRISS, W.E.: Modulation of Mitochondrial Adenylate Kinase by Citric-Acid-Cycle Intermediates Eur. J. Biochem, 43, 541-547, (1974)

53 PRICE, N.C., COHN, M. und SCHIRMER, R.H.: Fluorescent and Spin label probes of the Environments of the Sulfhydryl Groups of Porcine Muscle Adenylate Kinase J. of Biolog. Chem. 250, 644-652, (1975)

54 PRICE, N.C., REED, G.H. und COHN, M.: Magnetic Resonance Studies of Substrate and Inhibitor Binding to Porcine Muscle Adenylate Kinase. Biochemistry, 12, 3322-3327, (1973)

55 PURICH, D.L. und FROMM, H.J.: Inhibition of rabbit Skeletal muscle Adenylate Kinase by the Transition state analogue P^1,P^4-di(adenosine-5') tetraphosphat Biochimica et Biophysica Acta, 276, 563-567, (1972)

56 PURSCHKE, R. und ZINDLER, M.: Maligne Hyperthermie-Klinik und Therapie einer lebensbedrohlichen Narkosekomplikation Chirurg 45, 472-476, (1974)

57 RAUEN, H.M.: Biochemisches Taschenbuch, Springer Verlag, Berlin, 1. Teil, 2. Auflage, (1964)

58 RIETBROCK, I.: Biotransformation von Inhalationsanästhetika und ihre Bedeutung für klinische Nebenwirkungen. Anaesthesist 24, 381-391, (1975)

59 ROODYN, D.B.: Enzyme-Cytology, 1967 Academic Press, London, NY, 139 ff, (1967)

60 SACHSENHEIMER, W., PAI, E.F., SCHULZ, G.E. und SCHIRMER, R.H.: Halothan Binds in the Adenine-Specific Niche of Cristalline Adenylate kinase FEBS Letters 79, 310-312, (1977)

61 SCHAPS, D., HAUENSCHILD, E. und HEMPELMANN, G.: "Maligne Hyperthermie" Anästhesiologische und Intensivmedizinische Praxis 12, 87-96, (1976)

62 SCHIRMER, R.H. und THUMA, E.: Sensitivity of Adenylate kinase Isozymes from normal and dystrophic human muscle to Sulfhydryl Reagents Biochimica et Biophysica Acta, 268. 92-97, (1972)

63 SCHMIDT, F.H.: Über die Bestimmung der Myokinase-(Adenylatkinase-)Aktivität im Serum Klinische Wochenschrift, 42, 476-478, (1964)

64 SCHMITT, J., SCHMIDT, K. und RITTER, H.: Hereditary Malignant Hyperpyrexia Associated with Muscle Adenylate Kinase Deficiency. Humangenetik, 24, 253-257, (1974)

65 SCHULZ, G.E., ELZINGA, M., MARX, F. und SCHIRMER, R.H.: Three-dimensional structure of adenyl kinase
Nature, 250, 120-123, (1974)

66 STEWARD, A., ALLOTT, P.R., COWLES, A.L. und MAPLESON, W.W.: Solubility Coefficients for inhaled Anaesthetics for Water, Oil and Biological Media
Brit. J. Anaesth. 45, 282-293, (1973)

67 STIER, A.: Der Stoffwechsel des Halothane und seine pharmakologisch-toxikologische Bedeutung. Habilitationsschrift, Universität Würzburg (1965)

68 PAN, TAI-HSIUNG: Malignant Hyperthermia associated with Enflurane Anaesthesia
A case report
Anaesthesia and Analgesia, 54, 47-49, (1975)

69 TURNER, D.C. und BRAND, L.: Quantitative Estimation of Protein Binding Site Polarity. Fluorescence of N-Arylaminonaphthalenesulfonates
Biochemistry, 7, 3381-3390, (1968)

70 VAN DEN HENDE, C., LISTER, D., MUYLLE, E., OOMS, L. und OYAERT, W.: Malignant Hyperthermia in Belgian Landrace pigs rested or exercised before exposure to Halothane
Brit. J. Anaesth., 48, 821-828, (1976)

71 WADHWA, R.K., M.D.: Obstetric Anesthesia for a Patient with MH Susceptibility
Anesthesiology 46, 63-64, (1977)

72 WINGARD, D.W.: Malignant Hyperthermia: A human Stress Syndrome?
The Lancet 1974 II, 2, 1450-1451

73 ZINGANELL, K., KREUTZ, F.H. und SUCHENWIRTH, R.: Enzymveränderungen, Myoglobinurie und Muskelnekrosen nach Maligner Hyperpyrexie
Z. prakt. Anästh., 7, 161-167, (1972)

Abkürzungen

AK	Adenylatkinase
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
Anfällige, anfällige	Individuen: Personen, die an Maligner Hyperthermie erkranken können.
ANS	1-Anilinonaphthalin-8-Sulfonsäure-Mg-Salz
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	Cyclo-AMP
CK	Creatinkinase
CP	Creatinphosphat
EC	Energy Charge
Ink.-Lsg.	Inkubationslösung
LDH	Lactatdehydrogenase
Lsg	Lösung
MH	Maligne Hyperthermie
MH-Schweine	Schweine, die an MH erkrankt sind
NADH	Reduz. Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NaK-ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
Nichtanfällige, nicht anfällige	Individuen: Personen, die nicht an Maligner Hyperthermie erkranken können.
PEP	Phosphoenolpyruvat
Phys. NaCl-Lsg.	Physiologische Kochsalzlösung
PK	Pyruvatkinase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum

L E B E N S L A U F

Am 27. 12. 1949 wurde ich, Rolf Günter Crasser, als Sohn des Gottfried Crasser und der Ingeborg Crasser in Balingen geboren.
1956 Beginn der Grundschule
1960 Übertritt aufs Gymnasium Balingen. Am Gymnasium wählte ich den Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Zweig.
1968 Abitur
1968-1969 Erstes und zweites Chemiesemester an der Universität Tübingen
1969-1970 Wehrdienst
1970-1971 Ersatzdienst
1971-1973 Drittes bis siebtes Chemiesemester an der Universität Tübingen
19. Oktober 1972 Vorprüfung zur Diplomprüfung in Chemie bestanden
Oktober 1973 Beginn des Medizinstudiums an der Universität Tübingen. Das Chemiestudium habe ich abgebrochen.
25. 8. 1975 Ärztliche Vorprüfung bestanden
31. 3. 1977 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
15. 3. 1979 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
23. 4. 1979 bis 31. 3. 1980 Praktisches Jahr am Paracelsus-Krankenhaus in Ruit
24. 4. 1980 Ärztliche Prüfung
20. 5. 1980 Approbation als Arzt